



**Universidad de Los Andes  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Química  
Laboratorio de Investigaciones en Análisis Químico  
Industrial y Agropecuario (LIAQIA)**



## Trabajo Especial de Grado

### **Evaluación de parámetros fisicoquímicos de calidad en muestras de cacao venezolano.**

Br. Dianela N. Abreu C.

**Tutor:** Prof. Alexis Zambrano

**Cotutor:** Profa. Yelitza Delgado

Mérida, 04 diciembre de 2023

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>8</b>
<b>2.</b>	<b>MARCO TEÓRICO</b>	<b>10</b>
2.1.	Generalidades del cacao	10
2.2.	Clasificación del cacao	11
2.2.1.	Clasificación botánica	11
2.2.2.	Clasificación comercial	12
2.2.3.	Clasificación de acuerdo a la calidad	12
2.3.	Origen y expansión del cacao	13
2.4.	Historia y producción en Venezuela	14
2.5.	Beneficio del cacao	15
2.5.1.	Cosecha	15
2.5.2.	Postcosecha	16
2.6.	Calidad del cacao	17
2.6.1.	Atributos físicos	18
2.6.2.	Atributos químicos	20
2.6.3.	Atributos sensoriales	22
2.7.	Control de calidad en Venezuela	23
2.8.	Técnicas a emplear en los análisis	24
2.8.1.	Espectroscopía de absorción molecular UV – visible	24
2.8.2.	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	26
2.8.3.	Espectroscopía de absorción atómica	31
<b>3.</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	<b>34</b>
3.1.	Estudios relacionados con los parámetros de control de calidad	34
3.2.	Estudios relacionados con los parámetros de seguridad alimentaria	37
3.3.	Estudios relacionados con el análisis sensorial	38
3.4.	Estudios relacionados con la determinación de teobromina y cafeína	40
<b>4.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO</b>	<b>43</b>
4.1.	Planteamiento del problema	43
4.2.	Hipótesis	44

4.3.	Objetivos	44
<b>5.</b>	<b>METODOLOGÍA</b>	<b>45</b>
5.1.	Toma de muestras	45
5.2.	Recepción de muestras	46
5.3.	Fraccionamiento y análisis preliminar	46
5.4.	Índice de almendra	47
5.5.	Determinación del porcentaje de cascarilla	47
5.6.	Prueba de corte	48
5.7.	Determinación del contenido de humedad	49
5.8.	Determinación de grasa cruda	49
5.9.	Determinación de metales pesados: cadmio, plomo y arsénico	50
5.10.	Determinación del contenido de teobromina y cafeína	52
5.11.	Determinación del índice de fermentación	53
5.12.	Evaluación de las características sensoriales de las muestras	54
<b>6.</b>	<b>ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>	<b>56</b>
6.1.	Recepción de muestras y su distribución geográfica	56
6.2.	Análisis de parámetros físicos	58
6.3.	Análisis de los contenidos de cadmio, plomo y arsénico en las muestras	67
6.4.	Análisis de los contenidos de teobromina y cafeína vía HPLC	73
6.5.	Análisis del índice de fermentación	77
6.6.	Análisis de las características sensoriales de las muestras	78
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>81</b>
<b>8.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>84</b>
	Apéndice 1. Carta de pruebas de corte para cacao	89
	Apéndice 2. Planilla para el análisis sensorial de cacao	90

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura N° 1:</b> Países productores de cacao a nivel mundial	10
<b>Figura N° 2:</b> Cacao según su clasificación botánica	12
<b>Figura N° 3:</b> Recipiente analizado donde se encontraron restos de cacao	14
<b>Figura N° 4:</b> Recolección de mazorcas de cacao	15
<b>Figura N° 5:</b> Semillas recubiertas por el mucílago	16
<b>Figura N° 6:</b> Bandejas para el secado del cacao	17
<b>Figura N° 7:</b> Prueba de corte de cacao	20
<b>Figura N° 8:</b> Estructuras moleculares de la teobromina, cafeína y teofilina	20
<b>Figura N° 9:</b> Diseño instrumental de espectrofotómetro de absorción molecular UV – visible	25
<b>Figura N° 10:</b> Separación de los componentes de una muestra en la columna cromatográfica	27
<b>Figura N° 11:</b> Instrumentación de la cromatografía líquida de alta resolución	31
<b>Figura N° 12:</b> Diseño instrumental de espectrofotómetro de absorción atómica	32
<b>Figura N° 13:</b> Toma de muestras	45
<b>Figura N° 14:</b> Punzón sacamuestras	45
<b>Figura N° 15:</b> Recepción de muestras en el laboratorio	46
<b>Figura N° 16:</b> Fraccionamiento y análisis preliminar de la muestra	46
<b>Figura N° 17:</b> Ejemplo de cuarteo de la muestra	47
<b>Figura N° 18:</b> Índice de almendra	47
<b>Figura N° 19:</b> Determinación del porcentaje de cascarilla	47
<b>Figura N° 20:</b> Prueba de corte	48
<b>Figura N° 21:</b> Prueba de corte de la muestra MC – 18	48
<b>Figura N° 22:</b> Determinación del contenido de humedad	49
<b>Figura N° 23:</b> Determinación de contenido de grasa cruda	50
<b>Figura N° 24:</b> Preparación del licor de cacao	51
<b>Figura N° 25:</b> Determinación del contenido de cadmio, plomo y arsénico	51
<b>Figura N° 26:</b> Preparación de la muestra	52
<b>Figura N° 27:</b> Proceso de separación y medición en el sistema cromatográfico	52

<b>Figura N° 28:</b> Equipo cromatográfico Waters Alliance 2690 empleado. Conectado a un módulo detector Waters 996 con arreglo de diodos	53
<b>Figura N° 29:</b> Procedimiento para la determinación del índice de fermentación	54
<b>Figura N° 30:</b> Esquema de trabajo para la evaluación sensorial de las muestras	54
<b>Figura N° 31:</b> Rueda de sabores propuesta por el Comité del Cacao de la Excelencia.	55
<b>Figura N° 32:</b> Mapa de Venezuela con ubicaciones de las muestras analizadas	56
<b>Figura N° 33:</b> Valores de humedad medidos con el medidor de humedad	58
<b>Figura N° 34:</b> Valores de humedad medidos de acuerdo a la Norma COVENIN	58
<b>Figura N° 35:</b> Clasificación del cacao con base al porcentaje de fermentación según la Norma COVENIN 50:1995	62
<b>Figura N° 36:</b> Clasificación del cacao con base al porcentaje de fermentación según la Norma COVENIN 50:2018	63
<b>Figura N° 37:</b> Porcentaje de granos criollos en las muestras analizadas	65
<b>Figura N° 38:</b> Clasificación del cacao con base al peso mínimo de 100 granos	65
<b>Figura N° 39:</b> Porcentaje de cascarilla de las muestras	66
<b>Figura N° 40:</b> Porcentaje de grasa cruda de las muestras	67
<b>Figura N° 41:</b> Curva de calibración para la determinación de cadmio en licor de cacao	69
<b>Figura N° 42:</b> Curva de calibración para la determinación de plomo en licor de cacao	69
<b>Figura N° 43:</b> Curva de calibración para la determinación de arsénico en licor de cacao	70
<b>Figura N° 44:</b> Concentración de cadmio (mg/kg) en las muestras	71
<b>Figura N° 45:</b> Concentración de plomo (mg/kg) en las muestras	72
<b>Figura N° 46:</b> Concentración de arsénico (mg/kg) en las muestras	72
<b>Figura N° 47:</b> Curva de calibración para la determinación de teobromina en cacao	74
<b>Figura N° 48:</b> Curva de calibración para la determinación de cafeína en cacao	74
<b>Figura N° 49:</b> Cromatograma de un cacao Criollo	75
<b>Figura N° 50:</b> Cromatograma de un cacao Trinitario	75

<b>Figura N° 51:</b> Cromatograma de un cacao Forastero	76
<b>Figura N° 52:</b> Gráfica de la relación T/C en función del porcentaje de cafeína	76
<b>Figura N° 53:</b> Índices de fermentación de las muestras	78
<b>Figura N° 54:</b> Gráfica de sedimentación	79
<b>Figura N° 55:</b> Gráfica de influencias	80

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla N° 1:</b> Requisitos de la norma COVENIN 50:1995	13
<b>Tabla N° 2:</b> Concentraciones máximas permitidas de contaminantes en muestras de cacao de acuerdo a la Norma COVENIN 50: 2018.	24
<b>Tabla N° 3:</b> Clasificación de métodos cromatográficos en columna	28
<b>Tabla N° 4:</b> Datos de la recepción de muestras	57
<b>Tabla N° 5:</b> Resultados del fraccionamiento y análisis preliminar	60
<b>Tabla N° 6:</b> Resultados de la prueba de corte	61
<b>Tabla N° 7:</b> Parámetros empleados en el Espectrómetro de absorción atómica Perkin Elmer AAnalyst 600	68
<b>Tabla N° 8:</b> Parámetros de las curvas de calibración de cadmio, plomo y arsénico	68
<b>Tabla N° 9:</b> Parámetros empleados en el equipo cromatográfico Waters Alliance 2690, conectado a un módulo detector Waters 996 con arreglo de diodos	73
<b>Tabla N° 10:</b> Parámetros de las curvas de calibración de teobromina y cafeína	73
<b>Tabla N° 11:</b> Especificaciones del equipo de absorción molecular en el UV – visible	77

## 1. INTRODUCCIÓN

El cacao es un fruto del género *Theobroma* (“alimento de los dioses” en griego), originado hace millones de años al este de Los Andes, en Sudamérica. Existen 22 especies aceptadas de este género [Cuatrecasas, 1964], siendo la más conocida: *Theobroma cacao* L., debido a su importancia económica a causa de la amplia comercialización del mismo a nivel mundial [Girón *et al.*, 2007]. Este fruto tiene diversos usos como la preparación de aromatizantes, la producción de aceites esenciales y su uso en la industria farmacéutica – cosmética. Sin embargo, en la industria de alimentos ha tenido su mayor apogeo, los granos del mismo se tuestan y refinan para obtener una amplia gama de productos como el licor de cacao, manteca de cacao, chocolates, bombones y coberturas.

En Venezuela, el cacao siempre ha sido de gran importancia en la historia y economía del país. Durante la época de la colonia, al ser un producto del nuevo continente sumamente valorado y de los más codiciados por los europeos, se propagó el cultivo de cacao Criollo desde la región occidental del país, específicamente desde la zona de Sur del Lago de Maracaibo, hacia la cordillera centro norte de Venezuela, donde hoy en día, aún se aplican prácticas postcosecha ancestrales y que han sido heredadas de generación en generación, obteniendo productos extrafinos y finos de aroma apreciados por diversos artesanos y empresas a nivel mundial [Pérez *et al.*, 2021].

Al ser éste un rubro ampliamente usado desde la antigüedad, con una creciente demanda a nivel mundial y conociendo que parte de su calidad aromática deriva de su zona de origen, se hace necesario controlar los procesos que van desde la siembra hasta la obtención del grano, en la búsqueda de un perfil sensorial único que pueda ser mantenido utilizando técnicas postcosecha, con el fin de adaptarse a las nuevas tendencias y corrientes como el “bean to bar”, que buscan la elaboración de chocolates con una alta diferenciación, que además, ofrecen una gran oportunidad a los países latinoamericanos para incrementar y diversificar sus exportaciones de cacao a mercados de alto valor.

En el presente trabajo de investigación, fueron analizadas 22 muestras provenientes de diversas regiones de Venezuela. Para ello, fueron evaluados los parámetros físicos, químicos y sensoriales de las mismas, siguiendo las regulaciones establecidas por las normas de la Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN), y la regulación de la Comisión Reguladora de la Unión Europea para el caso particular del cadmio. Además, fueron empleadas metodologías siguiendo normas internacionales, como la determinación de metales pesados realizada siguiendo el Método Oficial de la AOAC, así como el protocolo de evaluación sensorial siguiendo los parámetros del Comité del Cacao de la Excelencia. Todo esto permitió realizar un estudio de control de calidad y clasificar las muestras como cacaos extrafinos, finos de primera y finos de segunda, además de verificar que sean aptos para elaborar productos derivados de los mismos.

Adicionalmente, se realizó un estudio para la determinación de los contenidos de teobromina y cafeína en los cacaos analizados, utilizando la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En este análisis fueron caracterizadas las muestras por medio de la relación teobromina/cafeína, de acuerdo a su genotipo como cacaos Criollos, Trinitarios y Forasteros. Finalmente, se ejecutó el análisis sensorial de las muestras a través de un grupo de panelistas entrenados en la cata de este rubro. En el mismo, fue posible realizar la detección de atributos y defectos para complementar el estudio de calidad y además, se empleó un análisis de componentes principales para determinar cuáles de estas variables tienen mayor relevancia al momento de caracterizar los cacaos.

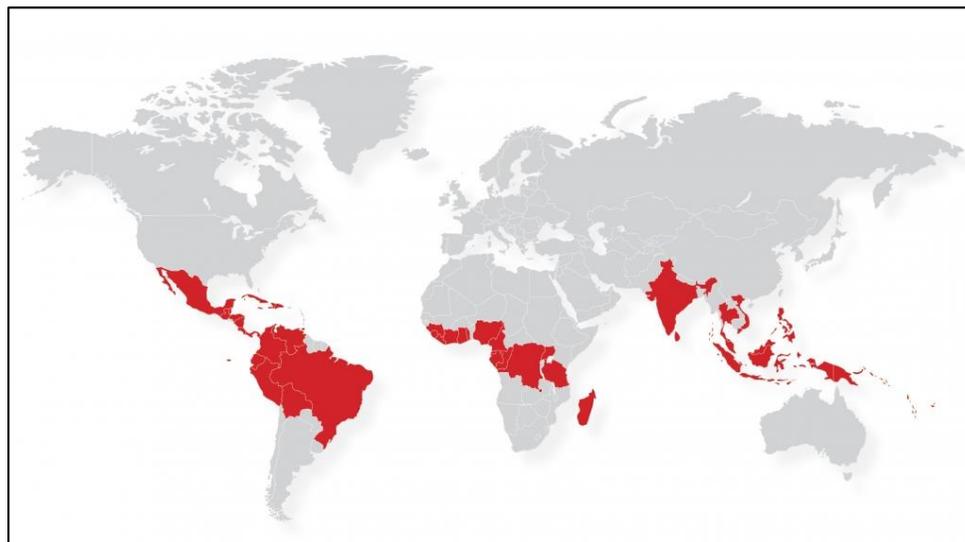
## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Generalidades del cacao.

Se denomina cacao a la planta *Theobroma cacao* Linneus y las semillas obtenidas a partir de la misma, conocidas como granos o almendras. Ésta es perteneciente a la familia *Malvaceae* y su domesticación más antigua se encuentra en la cuenca alta del río Amazonas en Ecuador. Se divide en 22 especies (Cuatrecasas *et al.*, 1964), de las cuales, 19 de ellas pueden ser ubicadas en América del Sur (Leal *et al.*, 1997). Este es un rubro ampliamente conocido, por ser la materia más importante para la elaboración del chocolate y otros productos derivados.

#### ➤ Condiciones climáticas que favorecen su producción.

El árbol cacaotero se produce en países que se encuentran 10° N y 10° S del Ecuador, los cuales poseen un clima caliente y húmedo, apropiado para su crecimiento. Este árbol necesita de sombra, por lo cual, crece junto a árboles más grandes como el cocotero o el árbol platanero, que además le proveen protección del viento. La altura ideal para su crecimiento es alrededor de 400 msnm y el terreno donde crece debe ser poroso y rico en nitrógeno, magnesio y potasio (Figura 1).



**Figura N° 1. Países productores de cacao a nivel mundial.**  
Fuente: página oficial de International Cocoa Organization (ICCO).

➤ **Temperatura y humedad ideal para un árbol cacaotero.**

Un clima caliente y húmedo es esencial para un óptimo crecimiento de la planta, se necesita una temperatura anual que se encuentre entre 18 y 32 °C, así como una humedad durante el día de hasta 100%, y durante la noche de 70 a 80%.

➤ **Condiciones del suelo para que pueda crecer una planta de cacao.**

El árbol cacaotero puede crecer en una amplia variedad de suelos, sin embargo, se necesita de partículas gruesas, una cantidad razonable de nutrientes y buenas propiedades en la retención de agua, así como un buen drenaje. Además, es importante que el suelo mantenga un pH entre 5,0 a 7,5; con un alto contenido de materia orgánica.

## **2.2. Clasificación del cacao.**

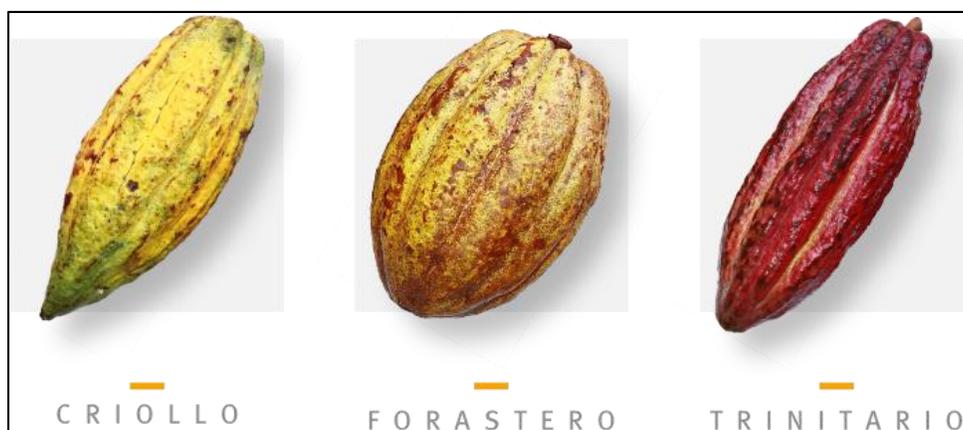
El cacao puede ser categorizado de acuerdo a diversos factores:

**2.2.1. Clasificación botánica:** de acuerdo a la diversidad genética que existe, se encuentra una amplia variedad de cacaos en el mundo (Figura 2). Sin embargo, la clasificación más sencilla aceptada hasta el día de hoy es la siguiente:

➤ **Cacao Criollo:** conformado por plantas de alto rendimiento y con una alta calidad aromática en sus semillas, su origen se encuentra en Suramérica y sus semillas se identifican por colores que van desde el marfil hasta el castaño claro, con un aroma y sabor dulce característico. Su fruto puede distinguirse por poseer una cascara suave y una curvatura que termina en una punta delgada. Esta variedad de cacao es catalogada como la más fina por su aroma y sabor, y permite producir chocolate de la más alta calidad [Estrada *et al.*, 2011; Cruz *et al.*, 2012].

➤ **Cacao Forastero:** se constituye por plantas con un alto rendimiento, una mayor tolerancia a las enfermedades, pero de menor calidad que el cacao Criollo, no obstante, es el cacao más cultivado en Brasil y África, representando un 90% de la producción a nivel mundial. Posee un mayor contenido de taninos y por tanto, un sabor más amargo, sus semillas se caracterizan por ser plana y de color oscuro [Estrada *et al.*, 2011; Cruz *et al.*, 2012].

➤ **Cacao Trinitario:** variedad resultante del cruce de los cacaos Criollo y Forastero, posee cualidades intermedias de ambas variedades, siendo un cacao más productivo que el Criollo, pero con una calidad aromática mayor que la del cacao Forastero. Este cacao es ampliamente cultivado hoy en día, puede ser encontrado en países como Trinidad y Tobago, Venezuela, Colombia, Granada, Jamaica, entre otros.



**Figura N° 2. Cacaos según su clasificación botánica.**

**2.2.2. Clasificación comercial:** en términos de la industria, a nivel mundial se han establecido las siguientes categorías del cacao de acuerdo a los sabores de los mismos:

- **Cacao fino o de aroma:** se define a este cacao como los granos provenientes de las variedades Criollo y Trinitario, que pueden ofrecer sabores finos como sabores a frutas frescas y maduras, florales, herbales, de madera, de frutos secos, malta y caramelo.
- **Cacao ordinario:** semillas que provienen de la variedad Forastero, que incluso al tener un buen manejo postcosecha no desarrollan ninguno de los sabores finos antes mencionados. Éstos son ampliamente usados en la fabricación de manteca de cacao y productos derivados del cacao tipo golosinas [Cruz *et al.*, 2012].

**2.2.3. Clasificación de acuerdo a la calidad:** en Venezuela, la norma COVENIN 50:1995 detalla tres categorías para clasificar y comercializar el cacao en el país (Tabla 1):

- **Cacao extrafino:** se define así a los granos bien fermentados de cacao Criollo, con ausencia de olores extraños o de cualquier signo de adulteración.

- **Cacao fino de primera (F<sub>1</sub>):** granos procedentes de cacao que al menos haya sido sometido al proceso de fermentación, y que no posea olores extraños o signos de adulteración.
- **Cacao fino de segunda (F<sub>2</sub>):** cacao no fermentado con un grado de fermentación de al menos 20%, ausencia de olores extraños y signos de adulteración.

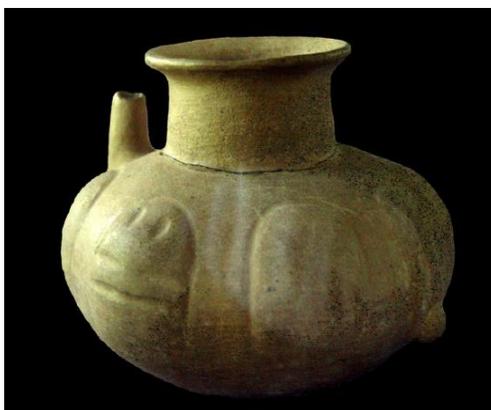
**Tabla N° 1. Requisitos de la norma COVENIN 50:1995.**

Requisitos	Extrafino	Fino de primera	Fino de segunda
Granos mohosos (%)	2	3	4
Granos partidos, dañados por insectos, planos, pizarrosos y negros (%)	2	3	8
Granos germinados (%)	2	3	6
Granos múltiples (%)	2	5	7
Granos insuficientemente fermentados (%)	5	20	80
Peso mínimo (g) de 100 granos	115	108	100

### 2.3. Origen y expansión del cacao.

La primera evidencia del uso y domesticación del cacao fue encontrada en Puerto Escondido, actualmente Honduras, y data de alrededor de 3500 años. Sin embargo, la región con la domesticación del cacao más antigua hasta ahora, se encuentra en la cuenca alta del río Amazonas en Ecuador, donde usando estudios genéticos se encontraron rastros de hace 5500 a 5300 años, donde el cacao era cultivado y consumido por la sociedad Mayo Chinchipe - Marañón y además, usado en intercambios comerciales con culturas de la costa [Henderson *et al.*, 2007; Valdez *et al.*, 2019].

Posteriormente, se extendió a una vasta región que engloba los países de Venezuela, Colombia, Perú, Bolivia y Brasil, donde además se ha generado una mayor variación de la especie. De igual forma, se tiene evidencia del cultivo de cacao en México hace alrededor de 3.000 años al menos, pero sigue siendo un misterio cómo llegó a América Central, se teoriza que se debe a las rutas comerciales entre civilizaciones aborígenes, ya que su propagación por medios naturales se ve perjudicada debido a la diversidad del ecosistema en la ruta (Figura 3).



**Figura N° 3. Recipiente analizado donde se encontraron restos de cacao.  
Fuente: Henderson (2007).**

Por otro lado, en estudios como los que plantea Ramírez (2015) en su investigación titulada “El cultivo del cacao venezolano a partir de Maruma”, se argumenta la posibilidad de orígenes distintos para el cacao Criollo y el cacao Forastero, debido a las diferencias que presentan en su inmunidad contra plagas y enfermedades, reforzando así, la hipótesis de que los cacaos Criollos no pueden provenir del cacao Forastero. Siendo así, se plantea la posibilidad de que el cacao Forastero tenga su origen en la cuenca alta del río Amazonas, mientras que el cacao Criollo tendría su origen en la zona del sur del Lago de Maracaibo, donde se expandió hacia la zona de Centroamérica y México. Todo esto respaldado por la gran biodiversidad que se encuentra en los cacaos Criollos provenientes de Sur del Lago de Maracaibo.

#### **2.4. Historia y producción en Venezuela.**

El cacao siempre ha sido de gran importancia en la historia y economía de Venezuela. Durante la época de la colonia, al ser un producto del nuevo continente sumamente valorado y de los más codiciados por los europeos, se propagó el cultivo de cacao Criollo desde la zona de Sur del Lago de Maracaibo, hacia la región central del país, donde hoy en día, aún se aplican prácticas postcosecha ancestrales que han sido heredadas por generaciones, obteniendo productos extrafinos y finos de aroma apreciados por diversos artesanos y empresas a nivel mundial.

Esta expansión dejó a su paso importantes poblaciones con tradición cacaotera como lo son Canoabo, Borburata y Patanemo en el estado Carabobo; Chuao, Cuyagua, Cata, Cumboto y

Ocumare en el estado Aragua, de igual forma en estado Miranda y el oriente de Venezuela. Trazando un recorrido significativo del cacao en la época colonial, generando que el mismo tuviera un alto impacto en los mercados internacionales, siendo Venezuela el primer exportador [Pérez *et al.*, 2021].

## 2.5. Beneficio del cacao.

El beneficio del cacao se ve definido por las etapas que comprenden la cosecha y postcosecha del mismo, los cuales influyen de manera directa en el aseguramiento de la calidad de los granos de cacao. A continuación se detalla cada uno de los procesos:

**2.5.1. Cosecha:** la producción de cacao genera dos cosechas anuales, en general las cosechas se producen en la temporada de abril a junio y posteriormente, de octubre a enero, este proceso se divide en las siguientes etapas:

➤ **Recolección:** consiste en retirar las mazorcas del árbol cacaotero cuando éstas alcanzan un nivel óptimo de madurez, esto puede evidenciarse en el tamaño de las mismas, así como en el color que presentan, que van desde amarillo hasta púrpuras y rojos. Si se recolectan frutos verdes o inmaduros, esto afectará directamente la percepción de sabores ya que los granos verdes generarán un aumento en el amargor y astringencia del cacao. Esta etapa debe ejecutarse con las herramientas adecuadas, como tijeras o medialunas, para no dañar los cojines florales del árbol (Figura 4).



Figura N° 4. Recolección de mazorcas de cacao. Fuente: archivo LIAQIA.

➤ **Desgrane:** se ejecuta al separar las semillas de la cáscara de la mazorca de forma manual, evitando dañar las almendras ya que serían más susceptibles al ataque de hongos y con un riguroso proceso de higiene para evitar la contaminación cruzada (Figura 5).



Figura N° 5. Semillas recubiertas por el mucílago. Fuente: archivo LIAQIA.

**2.5.2. Postcosecha:** en este proceso se busca resaltar los atributos presentes en el material genético cosechado mediante la conversión de proteínas y azúcares en moléculas más sencillas, ocurre una disminución del amargor y la astringencia. Se define por las siguientes etapas:

➤ **Fermentación:** etapa donde ocurre la transformación bioquímica en el interior de los granos de cacao, desarrollando los precursores de sabor y aroma de las almendras. Luego de haber sido extraídas las semillas de la mazorca, se depositan en recipientes que por lo general, suelen ser cajones de madera durante un periodo de 3 a 7 días según el genotipo del cacao y las condiciones ambientales, con volteos regulares en la masa de cacao para la oxigenación de la misma. Además de la importancia que tiene esta etapa en el desarrollo de aromas y sabores, también influye de forma directa en la calidad del cacao procesado, ya que determina el grado de fermentación del mismo, requisito indispensable en su clasificación.

➤ **Secado:** posterior a la fermentación, viene la etapa de secado donde ocurren nuevas reacciones bioquímicas, así como la eliminación de ácido acético producido previamente, este protocolo es de gran importancia ya que permite reducir la humedad del cacao a valores cercanos al 7%, para evitar la proliferación de hongos o agentes patógenos en la etapa de almacenamiento (Figura 6). El procedimiento más sencillo es el secado al sol, donde se emplean bandejas o mesas de madera para exponer los granos al sol durante el tiempo adecuado, removiendo la masa para asegurar la evaporación de humedad y ácidos volátiles.



Figura N° 6. Bandejas para el secado del cacao. Fuente: Machado (2018).

➤ **Almacenamiento:** en esta etapa, los granos deben ser embalados en costales hechos de fibras de fique y verificar que posean una humedad cercana al 7%, para su posterior almacenamiento en instalaciones cerradas y ventiladas, sobre estructuras de madera que no permitan el contacto directo con el suelo, donde además, sea fácil realizar una inspección visual, mientras espera a ser trasladado a manos de su comprador.

## 2.6. Calidad del cacao.

Se entiende por calidad, el grado de aceptación o satisfacción que un producto puede generar en sus usuarios. De esta manera, se hace necesario satisfacer las exigencias del mercado internacional que trabaja en el desarrollo y comercialización de chocolates y productos derivados del cacao, que requieren de un suministro sostenible y uniforme de cacao. Para lograr esto, es importante la implementación de buenas prácticas agrícolas y protocolos estandarizados de cosecha y postcosecha, con el fin de obtener productos saludables que

cumplan con los requisitos de seguridad alimentaria, con un alto rendimiento, que satisfagan las necesidades en cuanto a sabor y calidad que solicita el consumidor y que también se adapten a las exigencias físicas, químicas y sensoriales que solicitan los mercados. En tal sentido, se han establecido los siguientes parámetros que definen la calidad y salubridad de los granos de cacao para ser comercializados (COVENIN 50:1995):

**2.6.1. Atributos físicos:** los atributos de este tipo permiten clasificar el cacao de forma comercial o en el caso particular de Venezuela, de acuerdo a su calidad como se detalló previamente. Estos son factores determinantes en el rendimiento de material comestible que se obtendrá de una muestra de cacao:

➤ **Tamaño y uniformidad de los granos:** este parámetro define el índice de almendra de una muestra, conociendo los porcentajes de almendras grandes, medianas y pequeñas que la componen y por tanto, el rendimiento y ajustes que deben realizarse a los procesos de fabricación de chocolate.

➤ **Porcentaje de cascarilla:** se determina este porcentaje en una muestra para conocer la merma que representa la cascarilla en una muestra de cacao, encontrándose alrededor del 12%, un porcentaje mayor, significaría una disminución en el material comestible que se obtiene a partir de este cacao.

➤ **Porcentaje de grasa:** al determinar el contenido de grasa en un cacao, éste puede variar entre 44 y 55%, dependiendo del origen y genotipo del mismo, al conocer este parámetro, los compradores pueden precisar si el cacao es útil para las elaboraciones que realizan o si necesitan hacer alguna modificación de sus preparaciones.

➤ **Porcentaje de humedad:** la humedad presente en un cacao debe estar entre 7 y 8%. Un aumento en la misma implica el riesgo de proliferación de hongos, así como también la disminución de material comestible a partir de la muestra. De igual manera, un porcentaje de humedad muy bajo, provocará la fragilidad de las almendras y por ende, su rompimiento al momento de ser almacenadas y transportadas a su comprador.

➤ **Materia extraña:** afecta de forma directa al rendimiento de material comestible, puede afectar el sabor y contaminar el producto terminado. Puede ser clasificada en materia sin valor comercial, compuesta por ramas, piedras, pedazos de cuerda, trozos de

madera o metal, entre otros. Así como la materia extraña que se compone de cacaos fragmentados y cascarilla, que son más susceptibles al moho.

- **Granos múltiples:** también llamados granos aglomerados y descartados por muchos fabricantes, representando una pérdida importante cuando su porcentaje es alto.
- **Granos germinados:** puede observarse la fractura de la cascarilla por el crecimiento de la radícula de la almendra. También se regula el porcentaje de estos granos en diversas normas, ya que pueden afectar el sabor del producto final o permitir que el grano sea susceptible a hongos e insectos.
- **Granos pasilla:** granos cuyo espesor se encuentra de 2 a 6 mm.
- **Granos planos:** granos muy delgados con un espesor menor a 2 mm, en los que no es posible obtener el cotiledón al cortarlos, generando una merma en materia comestible.
- **Granos bien fermentados:** mediante un análisis visual se puede determinar el porcentaje de este tipo de almendras y se caracterizan porque al realizar la prueba de corte, presentan surcos profundos y definidos en ambas caras. Este es un atributo deseado en los análisis físicos, ya que el producto final será de mejor calidad.
- **Granos parcialmente fermentados:** al realizar la prueba de corte (Figura 7), los surcos hallados en ambas caras de la almendra no son lo suficientemente marcados.
- **Granos pizarrosos:** este tipo de granos pueden ser distinguidos porque en la prueba de corte, su superficie se mantiene lisa y compacta en su totalidad.
- **Granos dañados por insectos:** este tipo de granos infectados, merman la disponibilidad de material comestible y la salubridad del mismo.
- **Granos mohosos:** al cortar longitudinalmente, puede evidenciarse a simple vista la presencia de hongos en ambas caras de la almendra.
- **Granos negros:** en la prueba de corte, ambas caras de la almendra presentan un color negro que cubre al menos la mitad del grano.
- **Granos violetas:** al cortar estos granos, presentan una textura pizarrosa y un color violeta a lo largo de su superficie, evidenciando una fermentación deficiente.



Figura N° 7. Prueba de corte de cacao. Fuente: archivo LIAQIA.

**2.6.2. Atributos químicos:** a pesar de que la cuantificación de estos atributos no está directamente relacionada con la calidad del cacao y su clasificación, es importante la determinación de los mismos ya que existen especies químicas que dan origen a los atributos de sabor y aroma, mientras que otras de estas sustancias pueden afectar la salud de sus consumidores y se hace necesario la regulación de éstos.

➤ **Metilxantinas:** la teobromina, cafeína y teofilina son moléculas alcaloides (Figura 8), presentes en el cacao de forma natural, éstas se encuentran involucradas en el desarrollo de sabores y la cuantificación de las mismas permite conocer los contenidos de cacao en el chocolate [Davrieux *et al.*, 2007]. Por otra parte, se sabe que la relación que existe entre las concentraciones de teobromina y cafeína, permite conocer el genotipo de cacao en estudio.

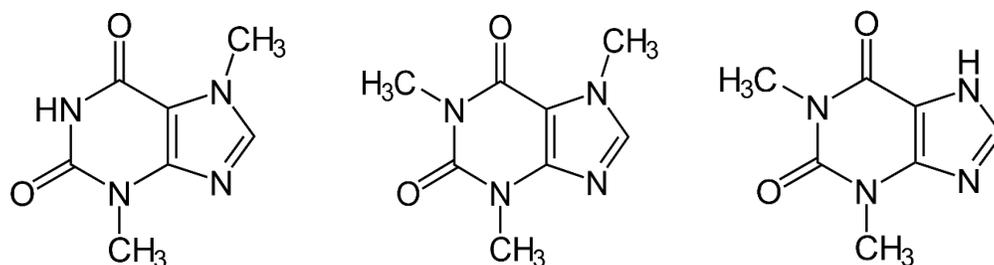


Figura N° 8. Estructuras moleculares de la teobromina, cafeína y teofilina, respectivamente.

➤ **Polifenoles:** compuestos químicos que poseen un anillo aromático con uno o más grupos hidróxilos, se les atribuye efectos antioxidantes, antitumorales, antiinflamatorios y antiaterosclerosis, haciendo de ellos compuestos deseados en los productos alimenticios por sus efectos benéficos en la salud humana. Este tipo de compuestos, junto con otras especies, son los responsables del sabor astringente en los chocolates. Los principales polifenoles que se encuentran en las almendras de cacao se conocen como flavonoides y estos se dividen en tres grupos: las catequinas, las antocianinas y las procianidinas.

Existen otros compuestos químicos que intervienen en la calidad del cacao tanto como precursores de aroma como compuestos de aroma, como las pirazinas, azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, entre otros. No obstante, no están contemplados directamente dentro de los criterios de calidad del cacao tanto para la producción como comercialización. Sin embargo, influyen directamente en la calidad sensorial del cacao [Espín y Samaniego, 2016].

Del mismo modo, el cacao también tiene otros compuestos químicos no deseados, los cuales pueden ser absorbidos por la planta durante su desarrollo o durante los procesos postcosecha o de almacenamiento y transporte, pero que sin son considerados en la normativa nacional e internacional. Entre dichos compuestos se tienen:

➤ **Metales pesados:** en diversas materias primas agrícolas como el cacao, se encuentran concentraciones de metales pesados que no son tolerados por el organismo humano y que son tóxicos. Por esto, diferentes organismos nacionales e internacionales se encargan de establecer límites máximos regulatorios, basados en la ingesta semanal tolerable con el fin de garantizar el bienestar de los consumidores. Entre los metales que se regulan hoy en día en el mercado internacional se encuentran:

❖ **Cadmio:** este es uno de los metales pesados más regulados en cuanto a cacao, debido a que es un carcinógeno que se acumula en los tejidos humanos y que puede presentarse en niveles elevados en los granos de cacao, ya sea asociado a altos niveles de cadmio en el suelo donde crece la planta o al uso de fertilizantes contaminados.

❖ **Plomo:** este es un metal pesado con la capacidad de acumularse en los tejidos humanos y generar insuficiencia renal y daños cerebrales. Sin embargo, de acuerdo a la European Food Safety Authority (2010), el cacao y sus productos derivados aportan menores

cantidades en la exposición al plomo, no obstante, sigue siendo importante realizar un seguimiento cuidadoso en la cadena de suministro para minimizar al máximo la contaminación con este metal.

Actualmente, no existen límites máximos permitidos para metales como el mercurio o arsénico en el cacao o subproductos en el mercado Europeo.

➤ **Micotoxinas:** estas son sustancias químicas tóxicas que producen los hongos y afectan diversos cultivos, la más peligrosa y controlada en el cacao es la Ocratoxina A (OTA), al tratarse de un compuesto carcinógeno, se trata de reducir su formación en los procesos de postcosecha, almacenamiento y transporte.

➤ **Residuos de plaguicidas:** a pesar de que los granos de cacao se encuentran cubiertos por la cascara y mazorca del fruto, al aplicar plaguicidas a los árboles de cacao, pueden encontrarse residuos en los productos de cacao, es por esto que se establecen límites máximos de residuos permitidos en la materia prima, es decir, en el grano.

**2.6.3. Atributos sensoriales:** este es uno de los criterios primordiales de evaluación del cacao que influye de forma directa sobre la calidad del mismo, donde un panel de cata se encarga de determinar la intensidad de sabores básicos, específicos e indeseados. Suele complementarse con la prueba de corte, ya que esto permite proporcionar información de aquellos defectos que pueden generar un amargor excesivo o astringencia debido a granos pizarrosos o verdes, así como sabores a humedad provenientes de granos mohosos. Entre los atributos que se analizan se pueden encontrar:

➤ **Sabores básicos:** presentes en todas las muestras de cacao y que deben encontrarse en equilibrio para generar satisfacción en los consumidores del producto:

❖ **Ácido:** proveniente de los ácidos volátiles y no volátiles presentes en el cacao.

❖ **Amargo:** sabor fuerte y característico del cacao, que al encontrarse en exceso puede ser ocasionado por una mala fermentación.

❖ **Dulce:** se debe a la glucosa que se encuentra de forma natural en el cacao.

❖ **Astringencia:** se refiere a la sensación de resequeza generada en el paladar al consumir la muestra, que por lo general se debe a la presencia de polifenoles y en exceso, debido a una mala fermentación del cacao.

➤ **Sabores específicos:** se desarrollan en los procesos bioquímicos que ocurren durante el beneficio del cacao, particularmente en la fermentación y el tostado, además, varían de un genotipo a otro:

❖ **Cacao:** sabor característico de los granos de cacao bien fermentados, relacionado también con el sabor a chocolate.

❖ **Floral:** sabores perfumados que por lo general se encuentran presentes en cacaos trinitarios.

❖ **Frutal:** sabores que pueden ser de frutas maduras, rojas o amarillas dependiendo de la tendencia de una muestra en particular.

❖ **Nueces y frutos secos:** sabores característicos de almendras, nueces y otros frutos secos, presentes en su mayoría en cacaos criollos.

➤ **Sabores adquiridos:** defectos presentes en el cacao, ocasionados por malas prácticas en los procesos de cosecha o postcosecha, o inducidos debido al alto contenido de grasa en el cacao, que tiene la capacidad de absorber eficazmente cualquier tipo de contaminación en el ambiente:

❖ **Moho:** sabor adquirido debido a contaminación por hongos en el cacao por un mal secado del mismo.

❖ **Químico:** sabores a combustible, desinfectantes o plaguicidas debido a un mal almacenamiento.

❖ **Verde:** sabor característico generado por la cosecha de frutos que no han madurado completamente.

❖ **Humo:** adquisición de sabores ahumados por contaminación de humo de madera.

## 2.7. Control de calidad en Venezuela

En Venezuela existe la Comisión Venezolana de Normas Industriales, cuyo acrónimo es COVENIN, un ente encargado de asegurar la estandarización y normalización bajo

lineamientos de calidad en Venezuela. En cuanto al cacao, se encuentran diversas normas que dan a conocer los requisitos que deben cumplir las semillas de cacao para considerarse aptas para la preparación de productos derivados de consumo humano. No obstante, aún no se considera el análisis sensorial como parte del proceso de evaluación de calidad de esta materia prima, a pesar de que a nivel internacional es primordial este tipo de análisis. En la Tabla 1 mostrada previamente y la Tabla 2, donde se describen los parámetros que deben ser analizados en el cacao para clasificar la materia prima de acuerdo al fin para el que será empleado:

**Tabla N° 2. Concentraciones máximas permitidas de contaminantes en muestras de cacao de acuerdo a la Norma COVENIN 50: 2018.**

<b>Contaminante</b>	<b>Concentración máxima recomendada (mg/kg)</b>
Cadmio	0,3
Cobre	15,0
Plomo	0,5
Arsénico	0,5
Mercurio	0,005
Ocratoxina A	0,010

## **2.8. Técnicas a emplear en los análisis**

### **2.8.1. Espectroscopía de absorción molecular UV – visible**

La espectroscopía de absorción molecular en la región UV – visible es ampliamente usada al analizar muestras de cacao, ya que permite la identificación cualitativa y cuantitativa de diversas especies orgánicas presentes en el mismo. En esta investigación se propone usar esta técnica para llevar a cabo el desarrollo de la metodología de determinación del índice de fermentación en cacao, donde se mide la absorbancia de los productos de la condensación de flavonoides y de las antocianinas a diferentes longitudes de onda.

**Fundamento:** esta técnica se basa en la absorción de radiación en la región ultravioleta – visible por parte de una molécula, generando la promoción de un electrón en su estado basal a un estado de mayor energía. En este proceso, una molécula en particular es capaz de absorber la energía transferida, disminuyendo así, la intensidad de radiación electromagnética incidente. Cada molécula puede absorber ciertas frecuencias de radiación y esto permite caracterizar la misma (Skoog, 2015).

Al emplear esta técnica, se estudia la siguiente ecuación, donde la transmitancia  $T$  representa la fracción de radiación que incidió en la muestra y que se representa a través de una potencia incidente  $P_0$  y la disminución de la misma a un valor  $P$  luego de incidir en la solución, esto se expresa de la siguiente forma:

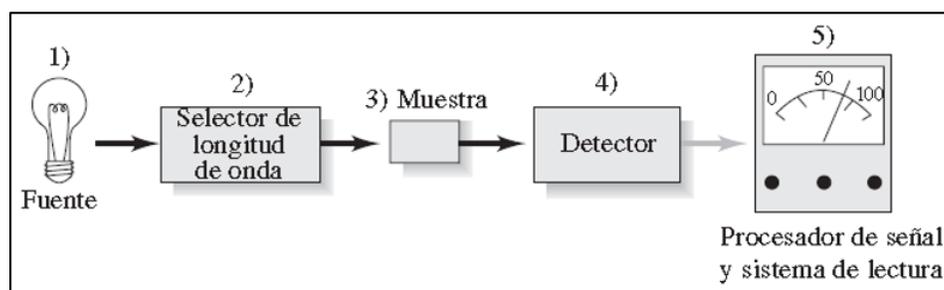
$$T = \frac{P}{P_0} \quad \text{Ec. 1}$$

Mediante la ecuación de absorbancia  $A$ , se puede evidenciar cómo la atenuación de radiación incidente se ve influenciada de forma directa por la concentración  $c$  del analito en solución y la longitud de trayectoria  $b$  donde ocurre la absorción, expresándose de acuerdo a la ley de Beer – Lambert como:

$$A = -\log(T) = -\log\left(\frac{P}{P_0}\right) = \log\left(\frac{P_0}{P}\right) = \epsilon bc \quad \text{Ec. 2}$$

Siendo  $\epsilon$  una constante de proporcionalidad llamada absorptividad molar.

**Instrumentación:** los equipos que permiten medir la absorción de radiación, por lo general se componen por una fuente, un filtro o monocromador para seleccionar la longitud de onda incidente, la cubeta o recipiente donde se encuentra la solución de analito, un transductor de la radiación, procesadores de señal y dispositivos para leer la respuesta, tal como se ejemplifica en la Figura 9.



**Figura N° 9. Diseño instrumental de espectrofotómetro de absorción molecular UV - visible.**  
Fuente: Skoog (2008).

A continuación, se describe cada uno de los componentes del espectrofotómetro:

❖ **Fuente:** se necesita una fuente estable de energía radiante, capaz de emitir un haz de radiación potente y fácil de medir, que además esté bien regulado. Estas fuentes suelen

dividirse en fuentes continuas que cambian de intensidad en función de la longitud de onda; o fuentes lineales, que abarcan un rango estrecho de longitudes de onda y generan cierta cantidad de líneas espectrales. En el caso de la absorción molecular suelen usarse las lámparas de hidrógeno y deuterio o lámparas de tungsteno/halógeno.

❖ **Selector de longitud de onda:** se emplea para aislar una región limitada del espectro para hacer las mediciones, esto incrementa la selectividad y sensibilidad del instrumento. Entre ellos, se encuentran los monocromadores o filtros, que permiten aislar la banda de longitud de onda deseada.

❖ **Cubeta de la muestra:** debe emplearse una celda de material transparente a la radiación de la región UV – visible, como el cuarzo o la sílice fundida.

❖ **Detector de radiación:** donde la energía es convertida en una señal eléctrica que puede ser medida. Se registra un cambio en las variables del sistema como la radiación electromagnética, siendo codificada y procesada para dar una respuesta fácil de interpretar por el analista.

❖ **Unidad de procesamiento y lectura de la señal:** se compone por un dispositivo electrónico, donde la señal eléctrica del detector puede ser amplificada y además, realizar operaciones matemáticas como la diferenciación, integración o conversión a logaritmo. En este componente del equipo, muchas veces se pueden controlar los parámetros instrumentales, procesar y almacenar los datos analizados, e imprimir los resultados y espectros generados (Skoog, 2015).

### 2.8.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Es una técnica que permite la separación de diversos componentes de una matriz compleja, antes de su determinación a través de un método instrumental. En los últimos años, ha sido ampliamente usada en el estudio de cacao y sus diversos componentes químicos, con el fin de optimizar los procesos que intervienen en la cadena de valor del cacao. En esta investigación se propone el uso de la misma, en la determinación de las metilxantinas teobromina y cafeína, no solo para su cuantificación, sino además, caracterizar y clasificar las muestras de cacao en estudio de acuerdo a sus genotipos.

➤ **Fundamento:** la cromatografía líquida de alta resolución se basa en la solubilidad de los analitos en las fases de la columna cromatográfica, la muestra se disuelve en la fase móvil

(líquida), la cual se hace pasar a través de la fase estacionaria (sólida e inmisible). De acuerdo a la afinidad que tengan los analitos por cada una de las fases, cada uno circulará a través de la columna a una velocidad diferente, es decir, que al salir de la columna, todas habrán eluido a un tiempo diferente y estarán separados y listos para ser cuantificadas. Para que esto ocurra de forma satisfactoria, las dos fases se eligen de manera que los componentes se distribuyan en distinto grado entre ambas fases. Los compuestos fuertemente retenidos en la fase estacionaria, se moverán más lento y serán los últimos en ser eluidos por la columna cromatográfica (Figura 10).

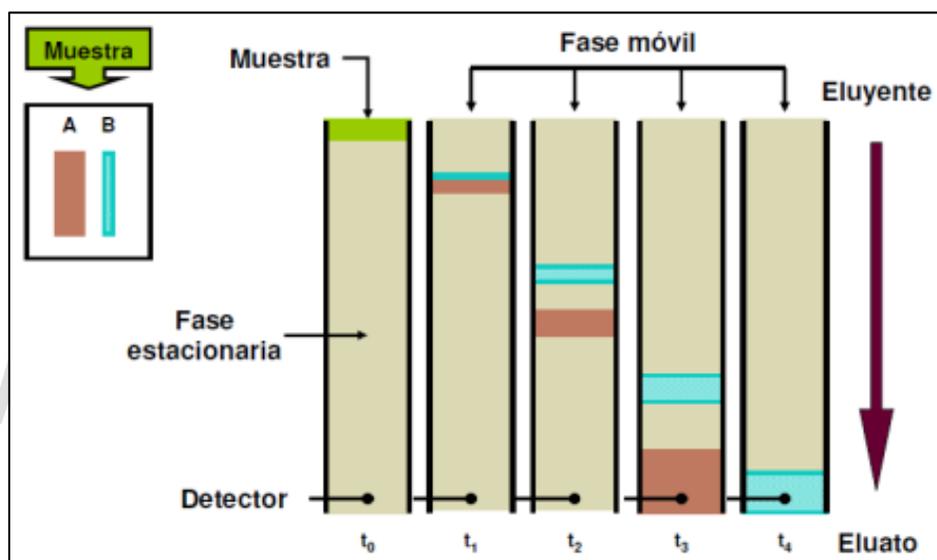


Figura N° 10. Separación de los componentes de una muestra en la columna cromatográfica.  
Fuente: Enrique Castaños, Cienciadelux (2015).

➤ **Clasificación de los métodos cromatográficos:** de forma general, se puede clasificar como cromatografía en columna o cromatografía plana, desarrollándose la primera dentro de una columna que contiene la fase estacionaria, mientras que la segunda se lleva a cabo sobre una placa o papel. Para entender mejor el tipo de cromatografía que se propone emplear, a continuación (Tabla 3), se describen cómo se encuentran clasificados los métodos cromatográficos en columna de forma más explícita:

**Tabla N° 3. Clasificación de métodos cromatográficos en columna. Fuente: Skoog (2015).**

Clasificación general	Método específico	Fase estacionaria	Tipo de equilibrio
1. Cromatografía de gases (CG)	a) Cromatografía gas – líquido	Líquido adsorbido o enlazado a una superficie sólida	Partición entre un gas y un líquido
	b) Cromatografía gas – sólido	Sólido	Adsorción
2. Cromatografía de líquidos (CL)	a) Líquido – líquido (reparto)	Líquido adsorbido o enlazado a una superficie sólida	Partición entre líquidos inmiscibles
	b) Líquido – sólido (adsorción)	Sólido	Adsorción
	c) Intercambio de iones	Resina de intercambio iónico	Intercambio iónico
	d) Exclusión por tamaño	Líquido en los intersticios de un sólido polimérico	Partición/tamizado
	e) Afinidad	Líquido grupo específico enlazado a una superficie sólida	Partición entre una superficie líquida y un líquido móvil
3. Cromatografía de fluidos supercríticos (CFS, fase móvil: fluido supercrítico)	-	Especies químicas orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Partición entre un fluido supercrítico y una superficie enlazada

➤ **Instrumentación:** los equipos modernos de cromatografía líquida de alta resolución requieren de una serie de componentes avanzados y más elaborados para su óptimo funcionamiento, esto se debe a la necesidad de usar un flujo presurizado que sea capaz de atravesar la columna a una velocidad adecuada, los componentes básicos de esta técnica son:

**Reservorio de la fase móvil y sistemas de tratamiento de disolventes:** el sistema debe contar con uno o más contenedores de vidrio de al menos 500 mL para cada uno de los solventes que se empleen en la fase móvil, la proporción de éstos se puede variar en el tiempo de forma programada, o mantenerse bajo una elución isocrática. Igualmente, se debe incluir un sistema que permita eliminar gases disueltos y polvo, puede ser un sistema de bombeo de vacío, sistema de destilación, un sistema de agitación o calentamiento, o también un sistema de burbujeo.

**Tuberías:** se deben emplear tuberías inertes a la fase móvil que pasa a través de ellas, éstas pueden ser de teflón o de acero inoxidable dependiendo de la ubicación que tengan y las altas presiones que deban soportar. Estas tuberías se emplean en la conexión del reservorio de

solvente hacia la bomba, la bomba al inyector, el inyector a los detectores, y finalmente, a un colector de fracciones.

**Uniones:** se emplean en la conexión de las tuberías y deben constar de dos piezas de acople perfecto, entre las características que se requieren de las mismas se encuentra que deben ser inertes a solventes y muestras, deben cerrar herméticamente y no contribuir al ensanchamiento de banda.

**Bomba:** esta es una parte fundamental del sistema cromatográfico, ya que permite impulsar la fase móvil desde el reservorio hasta el inyector y posteriormente, a la columna. Este componente debe ser capaz de generar presiones de hasta 6000 psi, tener una salida libre de pulsos, sus componentes deben ser resistentes a los diversos solventes que se emplean, y también deben tener tasas de flujo que van de 0,1 a 10 mL/min. Existen dos tipos de bombas: de pistón, también llamadas bombas reciprocantes; y las de desplazamiento continuo o bombas jeringas. Las primeras son las más usadas y versátiles.

**Sistema de gradientes:** este componente permite variar la composición porcentual de la fase móvil durante el análisis. Se puede mantener un régimen isocrático, de manera que la composición se mantenga constante durante todo el estudio, esta modalidad permite separar diversos componentes de una matriz. No obstante, cuando se analiza una gran cantidad de compuestos, se puede optar por usar un gradiente de solventes, donde se varía la proporción de los mismos en función del tiempo, para obtener resultados satisfactorios y en menor tiempo.

**Sistema de inyección:** dispositivo que permite introducir la muestra al sistema sin dificultar el paso del solvente. El más utilizado es el rizo de muestreo, éste puede ser intercambiado y existen opciones que van desde 1 hasta 100  $\mu\text{L}$ .

**Columna para HPLC:** parte esencial del sistema donde ocurre la separación de los componentes a analizar. Las más usadas son las columnas de relleno, hechas de acero inoxidable, con una longitud que puede variar de 5 a 25 cm y un diámetro interno de 3 a 5 mm, el relleno empleado suele estar conformado por una base de sílice rígida sobre la cual se adhiere un revestimiento de fase unida. De acuerdo a las polaridades relativas de la fase móvil y la fase estacionaria, se tienen dos tipos de relleno de columna:

a) **Relleno de fase normal:** donde se emplean fases estacionarias de elevada polaridad como el agua o el trietilenglicol, mientras que se hace uso de una fase móvil no polar, como el hexano.

b) **Relleno de fase inversa:** en la fase estacionaria suelen usarse cadenas de hidrocarburos para tener una baja polaridad, mientras que la fase móvil es polar y suele estar compuesta por agua, metanol, acetonitrilo, entre otros.

**Detector:** este componente permite ubicar la posición de cada analito al salir de la columna. Entre los requisitos que debe cumplir está tener un amplio rango de respuesta, poseer una respuesta lineal, no contribuir al ensanchamiento de banda, tener una sensibilidad adecuada, así como una buena relación señal/ruido. Estos se dividen en generales y selectivos:

a) **Detectores generales:** sensibles a una propiedad de la solución, como el índice de refracción, la constante dieléctrica o la densidad, registrando así cambios en la fase móvil.

▪ **Detector de índice de refracción:** es un detector universal y no destructivo, se encarga de medir el índice de refracción de la fase móvil pura y la fase móvil conteniendo la muestra, no obstante, tiene una baja sensibilidad.

b) **Detectores selectivos:** se basan en una propiedad del soluto como la absorbancia en UV, fluorescencia o corriente de difusión, que no corresponden a la fase móvil.

▪ **Detector UV:** es el detector más usado en cromatografía líquida, no es destructivo, se emplea en una gran variedad de analitos y permite cuantificarlos en el orden de los nanogramos, además, tiene una alta sensibilidad y no se ve afectado por cambios en el caudal o la temperatura. En este tipo de detector se encuentran el detector de onda fija, el detector de onda variable y el más novedoso, el detector de arreglo de diodos.

▪ **Detector de fluorescencia:** se emplea en sustancias que fluorescen de forma natural o debido a una derivatización previa. Este es un detector altamente sensible y selectivo, por lo cual permite el análisis de trazas.

▪ **Detector electroquímico:** detector altamente sensible y selectivo que permite la cuantificación de compuestos electrooxidables o electroreducibles, se basa en la amperometría, voltametria, coulombimetría y conductimetría.

**Sistema de toma y procesamiento de datos:** a partir de la señal obtenida del detector, en este sistema se registran y manipulan las fracciones de los componentes de la muestra y el cromatograma, donde puede hacerse la interpretación cualitativa y cuantitativa del análisis. Este sistema puede ser un registrador gráfico, un integrador o una computadora (Figura 11).

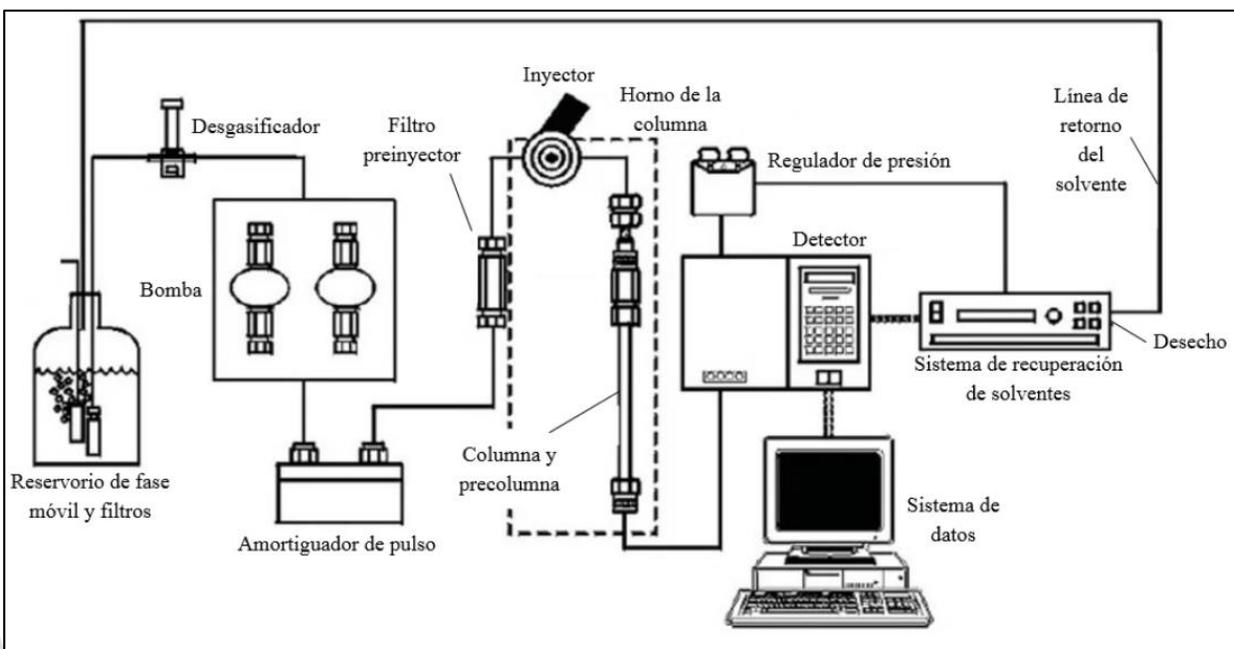


Figura N° 11. Instrumentación de la cromatografía líquida de alta resolución.

### 2.8.3. Espectroscopía de absorción atómica

La espectroscopía de absorción atómica es de gran importancia en el estudio de metales traza contaminantes en muestras de cacao. Esta técnica permite la determinación cuantitativa de los mismos, para la verificación del cumplimiento de los estándares de seguridad alimentaria nacionales e internacionales. En este estudio, se plantea evaluar las concentraciones de tres metales pesados: cadmio, plomo y arsénico, mediante esta técnica.

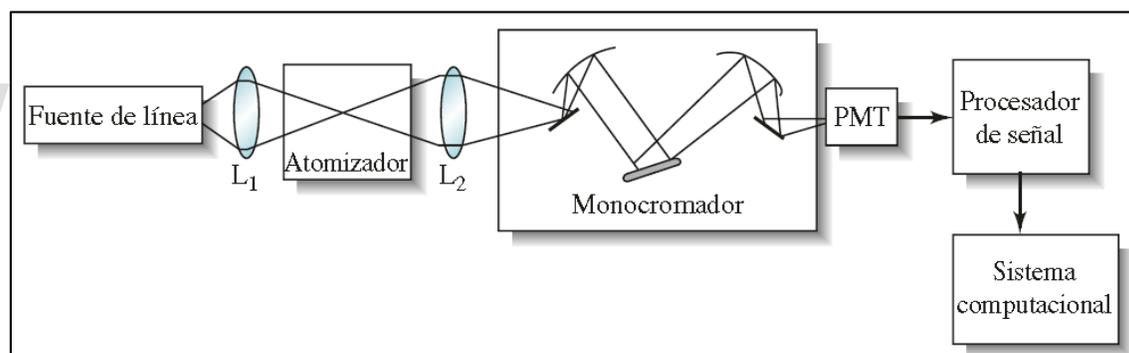
➤ **Fundamento:** la espectroscopía de absorción atómica se fundamenta en la absorción de radiación electromagnética en la región UV – vis por parte de un átomo o ion elemental. Para que esto ocurra, la muestra debe pasar por un proceso de atomización adecuado para ser volatilizada y descompuesta en átomos y iones en fase gaseosa. Este es uno de los pasos críticos en una determinación exitosa, con una buena sensibilidad, precisión y exactitud. Una vez atomizada la muestra, los electrones de la capa exterior del átomo pueden ser promovidos

a orbitales más altos y esta promoción será única para cada elemento en particular. Esta técnica, al igual que la espectroscopía de absorción molecular, se basa en la ley de Beer – Lambert, descrita previamente y que se rige por la expresión:

$$A = \epsilon bc$$

Siendo la absorción de energía por parte del átomo, directamente proporcional a la concentración del mismo, la longitud de trayectoria y la constante de absorción.

➤ **Instrumentación:** los equipos que se emplean en absorción atómica suelen tener un diseño sencillo que se resume en el uso de una fuente de líneas, un atomizador, un selector de longitud de onda, un detector, un procesador de señal y un dispositivo para leer la respuesta, tal como se observa a continuación en la Figura 12:



**Figura N° 12. Diseño instrumental de espectrofotómetro de absorción atómica.**  
**Fuente: Skoog (2015).**

❖ **Fuente de líneas:** este tipo de lámparas son ampliamente usadas en la espectroscopía de absorción atómica, ya que proporcionan líneas discretas en la región ultravioleta y visible, entre las más importantes se encuentra la lámpara de cátodo hueco y la lámpara de descarga sin electrodo.

❖ **Atomizador:** los atomizadores pueden ser de dos tipos, continuos y discretos, entre los atomizadores continuos se encuentra el plasma y la llama, donde la muestra es introducida de forma continua y estable, mientras que en los atomizadores discretos como el horno de grafito, la muestra se inyecta mediante una jeringa o un inyector automático. A continuación se describen los mismos:

a) **Atomizador de plasma acoplado inductivamente:** se conoce como plasma a una mezcla gaseosa que contiene iones cargados, que ha absorbido suficiente energía de una fuente externa y es capaz de proporcionar temperaturas que van desde los 6000 °C hasta los 8000 °C. Este tipo de atomizador ofrece una alta sensibilidad y menor probabilidad de interferencias en el análisis.

b) **Atomizador de llama:** se conforma por un nebulizador que convierte a la solución de la muestra en un aerosol, que posteriormente se inserta en un incinerador, donde se alcanzan temperaturas de 1.700 a 3.150 °C.

c) **Atomizador electrotérmico:** en este tipo de atomizadores, la muestra se introduce en un horno de volumen confinado, donde ocurre una serie de etapas que va desde el secado y la incineración hasta la atomización, alcanzando temperaturas de 1200 a 3000 °C, se dice que éstos ofrecen una mayor sensibilidad debido al corto tiempo de atomización.

❖ **Selector de longitud de onda:** por lo general, se emplea un monocromador ubicado entre el atomizador y el detector, con el fin de modular la salida de la fuente y poder discriminar entre la radiación que proviene de la lámpara y la que proviene del atomizador.

❖ **Detector:** en este componente, la energía se convierte en una señal eléctrica que puede ser medida, en la técnica de absorción atómica en horno de grafito, es común el uso de tubos fotomultiplicadores en el sistema de detección, debido a su alta sensibilidad en la región UV – visible.

❖ **Procesamiento y lectura de la señal:** dispositivo electrónico donde la señal que proviene del detector puede ser analizada, procesada y almacenada.

### 3. ANTECEDENTES

Diversos estudios han sido publicados en el análisis físico, químico y sensorial del cacao, cada uno de estos guarda relación con el presente trabajo de investigación, ya que los mismos poseen información relevante que será usada como antecedente de este estudio. A continuación, se presenta una serie de trabajos en función de los criterios de calidad que se desean estudiar, los parámetros de seguridad alimentaria, el análisis sensorial de cacao, así como también, el análisis de los contenidos de teobromina y cafeína en cacao con el fin de conocer el genotipo de la muestra en estudio.

#### 3.1. Estudios relacionados con los parámetros de control de calidad.

Krämer *et al.* (2015) realizaron el trabajo “Fast and neat – Determination of biochemical quality parameters in cocoa using near infrared spectroscopy”, cuyo objetivo es el desarrollo de un método espectroscópico en el infrarrojo cercano (NIRS) que permita una predicción analítica de los parámetros de calidad bioquímica del cacao. En esta investigación, se hizo la determinación de diversas sustancias fenólicas, ácidos orgánicos y metilxantinas, entre las cuales se encuentran la theobromina y la cafeína, así como el tiempo de fermentación, contenido de grasa y contenido de humedad. Para ello se empleó un espectrómetro de transformada de Fourier en el Infrarrojo cercano (FT – NIR) y se realizaron las mediciones directamente sobre el material recién molido, como técnica comparativa se emplearon las mediciones hechas a través de un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Este trabajo permitió demostrar la aplicabilidad de la técnica NIRS en el análisis de control de calidad del cacao, como una alternativa rápida y amigable con el ambiente, que además permite determinar y cuantificar de manera simultánea diferentes componentes precursores de los sabores en el cacao.

Posteriormente, en Brasil se publicó un estudio similar titulado “Quality Control of Commercial Cocoa Beans (*Theobroma cacao* L.) by Near – Infrared Spectroscopy”, donde se realizaba el análisis de ochenta y un muestras de cacao fermentado y seco, originarias de cuatro estados brasileños. En el mismo, se comprobó la utilidad de la técnica NIR en conjunto con la quimiometría, ya que ambas herramientas pueden ser empleadas de manera exitosa en

toda la cadena productiva de cacao para monitorear simultáneamente la humedad, pH, acidez y sustancias fenólicas que son importantes en el proceso de fermentación, así como también realizar el estudio de parámetros como la theobromina, la cafeína y los compuestos fenólicos, que se relacionan directamente con el perfil sensorial de los productos derivados del cacao [Hashimoto *et al.*, 2018].

En Venezuela, Álvarez *et al.* (2018) realizó un estudio de investigación donde se plantea establecer un perfil de calidad comercial para el cacao en cinco centrales de producción ubicadas en Bolívar, Mérida, Miranda, Portuguesa y Sucre empleando los métodos de la Association of Official Analytical Chemists International (AOACI) y la Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). En dicho trabajo se analizaron atributos físicos como dimensión y peso de las semillas de cada muestra, el porcentaje de cascarilla y el grado de fermentación a través de la prueba de corte. Igualmente, se analizaron atributos químicos como la humedad, cenizas totales, proteínas, polifenoles, grasa cruda, pH y acidez. Se observaron diferencias en los índices de almendra y dimensiones hallados para las muestras de cada región, se encontró que los valores de humedad no cumplen con lo establecido en la norma y se obtuvieron dos grupos de muestras de acuerdo al contenido de grasa, siendo unos mayores a 53% y otros menores a este valor. El análisis de estos parámetros permitió diferenciar entre los tipos de cacao para la comercialización en el exterior, y se recalcó la importancia de complementar estos análisis con los respectivos perfiles sensoriales, análisis microbiológicos y de metales pesados que son exigidos por los compradores internacionales.

Asimismo, Yro *et al.* (2018) deciden evaluar el grado de fermentación de muestras de cacao de la variedad Forastero, provenientes de Bongouanou en Costa de Marfil, con el fin de realizar un análisis de control de calidad. La forma convencional para llevar a cabo esta evaluación es a través de una prueba de corte y un análisis visual, sin embargo, en este estudio proponen el desarrollo de un sistema confiable de visión artificial que permita identificar y clasificar los granos de cacao de forma automática. En los resultados de este trabajo se encontró que el sistema de visión artificial junto con una máquina de vectores de soporte (SVM) puede discriminar de forma precisa y confiable los granos de cacao en función del

grado de fermentación, convirtiéndose en una alternativa rápida para el análisis de calidad en cacao.

Por otra parte, en 2019 se propone analizar el grado de fermentación de muestras de cacao a través de un sistema de clasificación basado en una nariz electrónica. Para ello, fueron tomados 75 kg de cacao fresco cosechado en Trinidad, que se distribuyeron de forma uniforme en tres enfriadores de espuma de poliestireno donde se llevó a cabo la fermentación cuyos parámetros fueron supervisados. En este análisis se demostró que es factible determinar el grado de fermentación del cacao mediante un sistema de nariz electrónica, no obstante, se sugiere para posteriores análisis de este tipo, establecer una base de datos más amplia con diferentes variedades, orígenes y condiciones de fermentación, de manera que se pueda optimizar el método para ser usado de forma rápida y a un bajo costo en el estudio de control de calidad del cacao [Tan *et al.*, 2019].

Teye *et al.* (2019) publicaron el trabajo de investigación titulado “Cocoa bean and cocoa bean products quality evaluation by NIR spectroscopy and chemometrics: A Review”, en el cual se discute las aplicaciones de la técnica espectroscópica NIR y la quimiometría en la cadena de valor postcosecha del cacao y productos derivados, siendo éstas de gran utilidad en la caracterización, autenticación y diferenciación de granos de cacao de distintas variedades, así como la verificación de la composición química y de los atributos sensoriales. Después de una extensa revisión bibliográfica, en esta investigación concluyen que la espectroscopía NIR y la quimiometría podrían ser altamente exitosas en el análisis cualitativo y cuantitativo de productos derivados de cacao si se emplean en conjunto con un modelo multivariable apropiado y son trasladadas desde el laboratorio hasta el campo real de trabajo, debido a la urgencia de desarrollar instrumentos portátiles y asequibles para realizar las mediciones in situ en países en desarrollo, ayudando a mejorar la trazabilidad global y la producción de granos de cacao de alta calidad.

### **3.2. Estudios relacionados con los parámetros de seguridad alimentaria**

En 2014, se realizó un estudio en conjunto entre la Universidad Félix Houphouët Boigny en Costa de Marfil y la Universidad de Bordeaux en Francia, con el fin de determinar los

contenidos de tres metales pesados: cadmio, cromo y plomo, en un nuevo híbrido de cacao llamado “Mercedes”, reconocido por ser altamente productivo y que permitiría a Costa de Marfil mantenerse como país líder en la producción de cacao a nivel mundial. El muestreo se realizó en cuatro granjas del Centro de Investigación de Agronomía del país, y se emplearon como muestras los granos de cacao, el mucílago de la fruta, jugo fresco y jugo fermentado. Para el análisis, todas las muestras fueron mineralizadas por digestión en una mezcla de ácido nítrico y ácido clorhídrico 3:1, y también fueron purificadas. El extracto purificado se analizó en un equipo Perkin Elmer de Espectroscopía de Absorción Atómica con horno de grafito, con una exactitud de 0,5% y una precisión de 10% para cada elemento, las menores concentraciones fueron halladas para el cromo, mientras que las concentraciones de plomo y cadmio fueron significativamente mayores, siendo de (454,17 – 1690) ppb para el plomo y de (126,08 – 644,00) ppb para el cadmio. Se concluye la importancia de mantener un control de seguridad alimentaria mediante buenas prácticas agrícolas y de trazabilidad, así como también, se resalta la presencia de estos tres metales en conjunto en todas las muestras, los cuales se caracterizan por su afinidad física y química para unirse [Yapo *et al.*, 2014].

Por su parte, Romero *et al.* (2019) ejecutaron una investigación titulada “Content and the relationship between cadmium, nickel and lead concentrations in Ecuadorian cocoa beans from nine provinces”, donde realizaron el análisis de granos de cacao de nueve provincias productoras en Ecuador, para conocer los contenidos de níquel, plomo y cadmio en los mismos. Seis de las muestras se prepararon para ser analizadas por espectroscopía de absorción atómica en llama, mientras que para las otras tres muestras se empleó la absorción atómica en horno de grafito. Todas las muestras fueron molidas y homogeneizadas, se le añadió ácido nítrico y peróxido de hidrógeno para llevar a cabo la digestión ácida en horno microondas, bajo una rampa de calentamiento hasta alcanzar los 180 °C. En la investigación, las mayores concentraciones halladas fueron de níquel (entre 1,462 y 8,528 mg.kg<sup>-1</sup>), seguidas por plomo (0,502 a 1,966 mg.kg<sup>-1</sup>) y por último el cadmio (0,267 mg.kg<sup>-1</sup> a 1,715 mg.kg<sup>-1</sup>). No obstante, no se encontraron relaciones lineales o multivariadas entre los metales estudiados, por lo cual, parece no ser necesario considerar el desarrollo de técnicas de remediación por competencia de metales, ya que aparentemente, no existe una competencia entre los mismos.

En septiembre del mismo año, se publicó un estudio donde buscaban analizar los contenidos de metales pesados en granos de cacao durante el proceso de beneficio. Para ello, recolectaron muestras aleatorias de mazorcas de cacao y se procedió a realizar el proceso de fermentación y secado, tomando muestras de forma periódica. A cada una de las muestras se le realizó el análisis de humedad, pH de la testa, índice de almendra y porcentaje de la testa. Posteriormente, las muestras fueron llevadas al horno por 24 h a 75 °C para proceder a descascarillarlas y triturarlas, una vez hecho esto, se llevaron a digestión con ácido nítrico por 6 h, se friltaron y la extracción se enrasó en matraces de 50 mL. En las soluciones obtenidas se cuantificó las concentraciones de cadmio y plomo mediante la espectrometría de plasma de emisión óptica bajo la norma EPA 6010 C. En cuanto al análisis de metales pesados, se encontraron concentraciones de 0,89 mg.kg<sup>-1</sup> de cadmio y 0,37 mg.kg<sup>-1</sup> de plomo en fase de mucílago, valores que descendieron en la fase de fermentación debido a la pérdida de agua con sólidos solubles totales, así como la transformación de azúcares que permiten la disminución de estos metales, sin embargo, en el secado aumentaron las concentraciones de metales analizados debido a la pérdida de agua y mineralización de los granos, e incluso superan las concentraciones de la fase de mucílago [Intriago *et al.*, 2019].

### **3.3. Estudios relacionados con el análisis sensorial**

En Colombia, Guzmán *et al.* (2014) plantea un trabajo de investigación en el departamento de Bolívar, con el fin de evaluar las características sensoriales del cacao en seis municipios del sur. Este análisis fue complementado con el análisis físico del grano de acuerdo a la Norma Técnica Colombiana 1252 para poder determinar el tamaño del grano, así como la cantidad de pasilla, granos infestados, dañados por insectos, mohosos, materia extraña, germinados, ahumados y múltiples. Igualmente, se realizó un análisis químico que incluía la determinación de sólidos solubles totales, pH y acidez total titulable para conocer el porcentaje de ácido oleico presente; de acuerdo a las normas de la AOAC se determinaron los valores de humedad y cenizas. Por otra parte, el cacao fue recolectado en forma de mazorca y también como cacao beneficiado, luego del beneficio, fue tostado entre 150 y 155 °C por 30 minutos, descascarillado y molido hasta obtener el licor. Para el análisis sensorial, se contó con la participación de 18 jueces pertenecientes al panel sensorial de la Universidad de San Buenaventura en Cartagena, los mismos evaluaron 16 parámetros: tres de aroma y 13

de sabor. Se consideraron descriptores como almendra, amargo, frutos secos, astringente, nuez, verde y ácido; mientras que, descriptores como los frutales, florales, caramelo, vainilla, malta y moho no fueron encontrados en las muestras. Se concluye que todas las muestras fueron caracterizadas por aromas a cacao y en algunos casos a frutos secos, mientras que en todas se encontró el sabor amargo y sabor a cacao. Los autores recalcan la importancia de practicar un buen manejo postcosecha, ya que el mismo tiene una gran repercusión en las características de sabor y aroma que se percibe en las muestras, con el fin de obtener un producto diferenciado por su calidad e inocuidad, lo cual influye positivamente en el precio de venta.

Posteriormente, aparece un nuevo estudio donde se complementa el análisis de calidad evaluando no solo los parámetros físicos y químicos, sino también sensoriales en 15 clones de cacao nacional en Ecuador. Se realizó el muestreo de mazorcas de cacao, las cuales fueron beneficiadas de forma homogénea, para ser analizadas. Dentro de las variables físicas estudiadas está el índice de almendra, índice de mazorca, número de almendras por mazorca, peso de cien semillas y pH de la testa, así como también, el contenido de humedad. Posteriormente, se determinaron variables químicas como el porcentaje de grasa, energía y ceniza. Para el análisis sensorial, se contó con la participación de cinco jueces catadores que evaluaron atributos como la acidez, amargor, astringencia, dulce, cacao, floral, frutal, nuez y defectos como el verde, en una escala entre 1 y 5. Tres de las muestras se destacaron por su pronunciado sabor a cacao, mientras que otra de ellas se destacó por presentar sabores florales. En todas las muestras se encontraron sabores frutales en mayor o menor proporción. No obstante, la muestra de cacao CCN – 51 presentó bajos valores en la escala en muchos de estos atributos, destacándose solo en sabores a cacao, amargor, acidez y sabor a verde [Vera *et al.*, 2014].

### **3.4. Estudios relacionados con la determinación de teobromina y cafeína**

Bispo *et al.* (2002) publicaron la investigación titulada “Simultaneous determination of caffeine, theobromine and theophylline by high – performance liquid chromatography”, con el fin de desarrollar una metodología analítica que permita determinar de forma simultánea la cafeína, teobromina y teofilina en muestras de orina, así como también en veinticinco

muestras de bebidas que incluyen el café, té, chocolate y agua de coco. Para ello, emplean la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa, la separación fue hecha utilizando una columna Bondesil C18 de 5  $\mu\text{m}$  con un diámetro de 4,0 mm y 15 cm de longitud. Durante el procedimiento, se hizo pasar una fase móvil de metanol, agua y ácido acético, o de etanol, agua y ácido acético (20:75:5), a una velocidad de 0,7 mL/min a través de la columna. El volumen de inyección usado fue de 20  $\mu\text{L}$  y se empleó un detector UV – visible Model 2550 a una longitud de onda de 273 nm. Las bebidas se prepararon de forma adecuada, la bebida achocolatada requirió ser desengrasada mediante el método Soxhlet con hexano y todas fueron filtradas; en el caso de la muestra de orina fue centrifugada y refrigerada a 40 °C hasta ser analizada. La separación se realizó en 12 minutos empleando la fase móvil con metanol, mientras que con el etanol se logró en 6min. Esta técnica permitió encontrar concentraciones de forma óptima, que van de 0,1 pg/mL a 350 mg/mL de cafeína, 0,1 pg/mL a 32 mg/mL de teobromina y 0,1 pg/mL a 47 mg/mL de teofilina. En las muestras de orina, las mayores concentraciones de cafeína fueron de personas fumadoras o que consumen grandes cantidades de café. Por otro lado, el mayor valor de teofilina fue hallado en la orina de una persona medicada con Talofilina. Este método parece ser apropiado para la separación y cuantificación simultánea de las metilxantinas en bebidas y orina humana, con una alta sensibilidad y sin requerir un pretratamiento o derivatización de la muestra.

De igual forma, Davrieux *et al.* (2004) estudiaron la determinación de cafeína y teobromina en cacao a través de espectroscopía en el infrarrojo cercano, para ello, analizaron 189 muestras de cacao provenientes de Costa de Marfil, Venezuela y Trinidad, en las mismas, abarcaron los tres tipos de cacao: Criollo, Trinitario y Forastero. Durante el análisis, para cada muestra se procedió a descascarillar, moler y tamizar 100 g; y se tomaron 3 g para ser analizados a través de reflexión difusa desde los 400 nm hasta los 2500 nm en un equipo Foss – Perstorp 6500. Este estudio permitió a los autores no solo determinar los contenidos de purinas en el cacao a través de una técnica no destructiva, sino además, plantear un gráfico de la relación de concentraciones de teobromina y cafeína, en función del contenido de cafeína, que permite discriminar en la genética y origen geográfico del cacao analizado, teniendo así, una herramienta que permitió distinguir los cacaos de Venezuela, Trinidad y Costa de Marfil.

Tres años después, se desarrolla una nueva investigación enfocada en el estudio de los contenidos de teobromina y cafeína, con el fin de profundizar en la clasificación del cacao de acuerdo a grupos genéticos. Publicación de gran importancia, ya que ofrece una herramienta analítica que permita autenticar los cacaos finos, como los cacaos Criollos y Trinitario, que además son cotizados a un mayor precio, además de tener la trazabilidad de los mismos. Para este estudio, nuevamente se hace uso de la espectroscopía en el infrarrojo cercano y el tratamiento de la muestra empleado es idéntico al de la referencia antes estudiada. Sin embargo, esta vez se amplía la base de datos al analizar 322 muestras de cacao: 57 de cacao Criollo, 148 de cacao Trinitario y 117 de cacao Forastero, pertenecientes a Venezuela, Trinidad y Costa de Marfil. Como método de referencia usan la determinación de las purinas vía HPLC aplicando una extracción en medio acuoso a las muestras, empleando un equipo Agilent serie 1100 con detector de arreglo de diodos para realizar las mediciones a 280 nm. Al graficar el contenido de cafeína en función del ratio teobromina – cafeína, se observa que los resultados se ajustan al modelo esperado, con una clara separación entre los cacaos Criollos y Trinitarios; y obteniendo gran variabilidad genética del cacao Trinitario, híbrido natural de los otros dos tipos. De igual forma, los investigadores realizaron la validación del método, para ello, seleccionaron 50 muestras aleatorias, con las 272 muestras restantes contruyeron un nuevo modelo siguiendo el método de mínimos cuadrados y verificaron que las 50 muestras seleccionadas se ajustaran a este nuevo modelo. Las 50 muestras adicionales fueron asignadas correctamente al genotipo correspondiente con un 96% de eficacia, no obstante, se sugiere realizar la caracterización de las muestras combinando ambos enfoques, así como también, complementar la información obtenida por esta vía con un análisis sensorial de las muestras, para definir el perfil de cada uno de los genotipos [Davrieux *et al.*, 2007].

Igualmente, en Venezuela se origina el trabajo de investigación titulado “Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high – performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching – column system”, donde se desarrolló un método cromatográfico en fase reversa que permita determinar teobromina, teofilina y cafeína en muestras de cacao. Para el análisis, las muestras fueron desengrasadas mediante el método Soxhlet. Posterior a esto, se procedió a realizar la extracción de las purinas empleando agua caliente en un baño termostatzado y en agitación.

La solución se dejó enfriar, se filtró y se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  de la muestra al sistema cromatográfico. El equipo cromatográfico Waters Alliance 2690 usado, contaba con un sistema de columnas intercambiables, en la primera etapa del procedimiento, la muestra es ingresada a una precolumna C18 (50mm x 4,6mm) haciendo pasar una fase de extracción compuesta por una solución acuosa al 1% de metanol, con una velocidad de flujo de 0,8 mL/min. En este punto, las purinas se retienen en la precolumna y se desechan los demás componentes de la matriz. En la siguiente etapa, los analitos son transferidos a una columna analítica NOVAPAK C18 (150 x 3,9mm) empleando una fase móvil al 20% de metanol en agua, con una velocidad de flujo de 1,4 mL/min y bajo condiciones isocráticas. La etapa final es el proceso de separación y la medición de los analitos en un detector de arreglo de diodos Waters 996 a 274 nm. El tiempo total del análisis por muestra fue de 10 minutos. Así, en este trabajo se logró, el desarrollo y validación de un método de rutina rápido, preciso y sensible para la determinación de metilxantinas en cacao, sin efecto de matriz. Por otra parte, nuevamente se propone un gráfico de relación teobromina/cafeína en función del porcentaje de cafeína que mantiene el comportamiento mostrado previamente y que permite darle una aplicación a este método en la clasificación del cacao de acuerdo a su genotipo [Brunetto *et al.*, 2007].

## **4. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO**

### **4.1. Planteamiento del problema**

Hasta finales del siglo XVIII, Venezuela era el primer productor mundial de cacao y lo comerciaba bajo el dominio de la colonia española, pero, desde hace algunas décadas, Venezuela pasó a exportar sólo una fracción de lo que, en la actualidad, transan grandes productores de cacao como es Costa de Marfil o Ghana. Si bien, el cacao venezolano sigue siendo apreciado por los fabricantes de chocolates de países como Japón o Suiza, que celebran su intenso sabor y aroma, algunos estudios indican que en los últimos años ha descendido su demanda internacional, atribuyéndose esto a distintos factores que perjudican de manera notable la calidad del mismo. Un estudio como este, al determinar las fortalezas y debilidades del cacao Venezolano, puede servir como punto de partida para la toma de acciones correctivas. Por tal motivo, se hace necesario, realizar esta investigación a fin de que se determine la calidad en varias muestras cacao, provenientes de diversas regiones de Venezuela y se evalúe si éstas se adecúan o no a las normas nacionales e internacionales vigentes.

www.bdigital.ula.ve

## 4.2. Hipótesis

La caracterización fisicoquímica y sensorial de muestras de cacao provenientes de diferentes regiones del país, permitiría el diagnóstico del estado de calidad del cacao Venezolano en base a estándares nacionales e internacionales.

## 4.3. Objetivos

### ➤ **Objetivo general**

Determinar la calidad de muestras de cacao venezolano por medio del análisis de sus propiedades fisicoquímicas y sensoriales de acuerdo a la normativa vigente.

### ➤ **Objetivos específicos**

- ❖ Evaluar la calidad de las muestras analizadas a través del cumplimiento de las normas nacionales e internacionales vigentes.
- ❖ Estudiar la calidad del cacao de acuerdo a las diferentes regiones productoras del país.
- ❖ Profundizar el análisis de las muestras mediante la determinación de sus concentraciones de teobromina y cafeína, con el fin de conocer el genotipo en estudio.
- ❖ Hacer uso de las herramientas que proporciona el análisis sensorial, para poder estimar la calidad en muestra y los atributos presentes de acuerdo a las regiones productoras.
- ❖ Verificar los parámetros de seguridad alimentaria por medio del estudio de cadmio, plomo y arsénico en el cacao de cada región.

## 5. METODOLOGÍA

En la norma COVENIN 50:1995 y su revisión de 2018, son descritos de forma explícita los requerimientos mínimos necesarios que deben cumplir los granos de cacao para considerarse aptos para la preparación de productos derivados de consumo humano. A continuación, se detallan las metodologías empleadas en esta investigación para el análisis físico, químico y sensorial del cacao, con el fin de clasificar las muestras estudiadas según los estándares de calidad nacional e internacional:

### 5.1. Toma de muestras

Para la toma de muestras, se programó el protocolo de acuerdo a la Norma COVENIN 1339:1995, donde se describen los siguientes pasos (Figura 13):

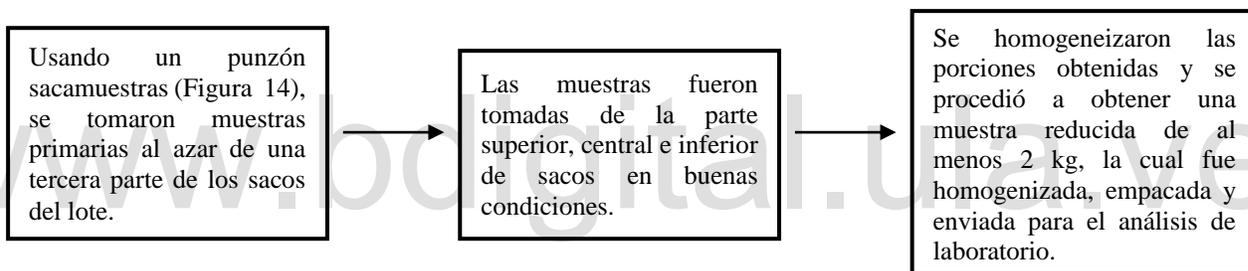


Figura N° 13. Toma de muestras.

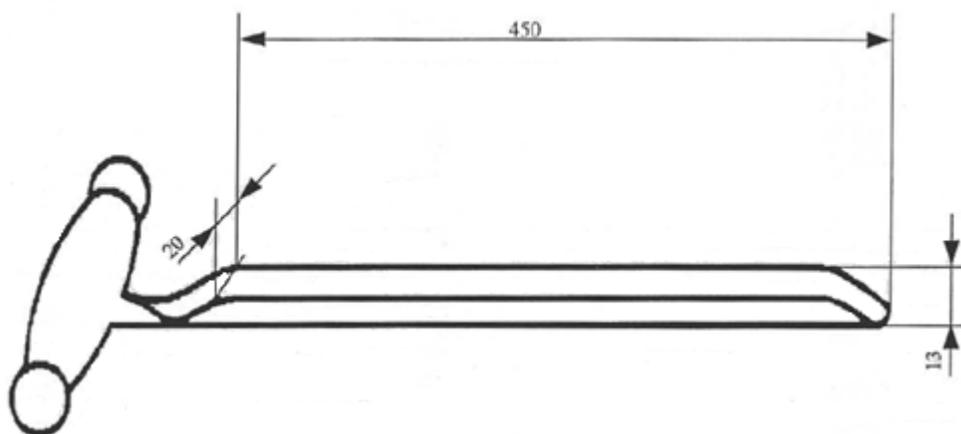


Figura N° 14. Punzón sacamuestras. Fuente: Norma COVENIN 1339:1995

## 5.2. Recepción de muestras

Ramos *et al.* (2014) en su manual propuesto para el análisis de calidad de cacao, describen los procesos a ejecutar para la evaluación de muestras (Figura 15). Tomando esta referencia, se planteó el siguiente procedimiento para la recepción de las mismas:

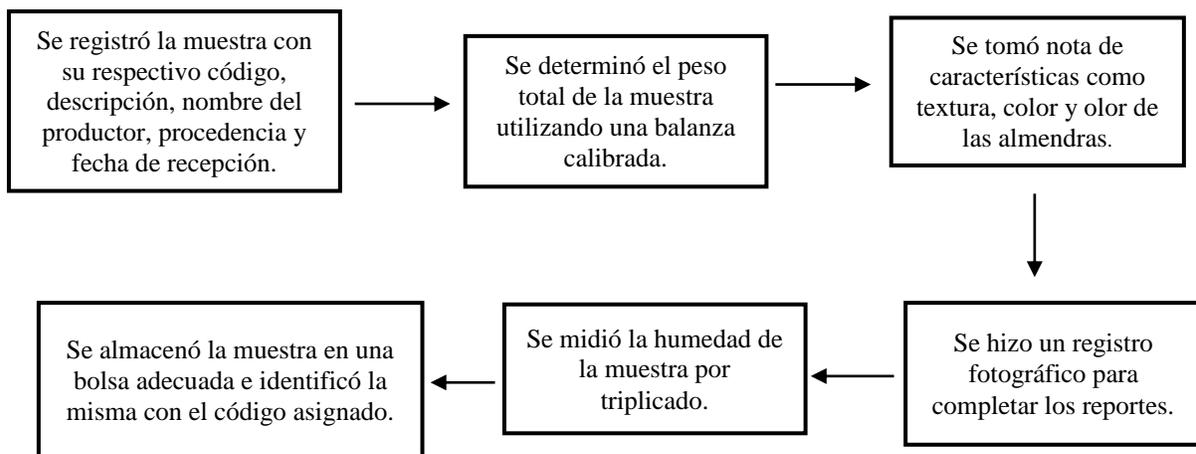


Figura N° 15. Recepción de muestras en el laboratorio.

## 5.3. Fraccionamiento y análisis preliminar

Siguiendo los procedimientos planteados por Ramos *et al.* (2014) se detalló el siguiente esquema para el fraccionamiento y análisis preliminares del cacao (Figuras 16 y 17):

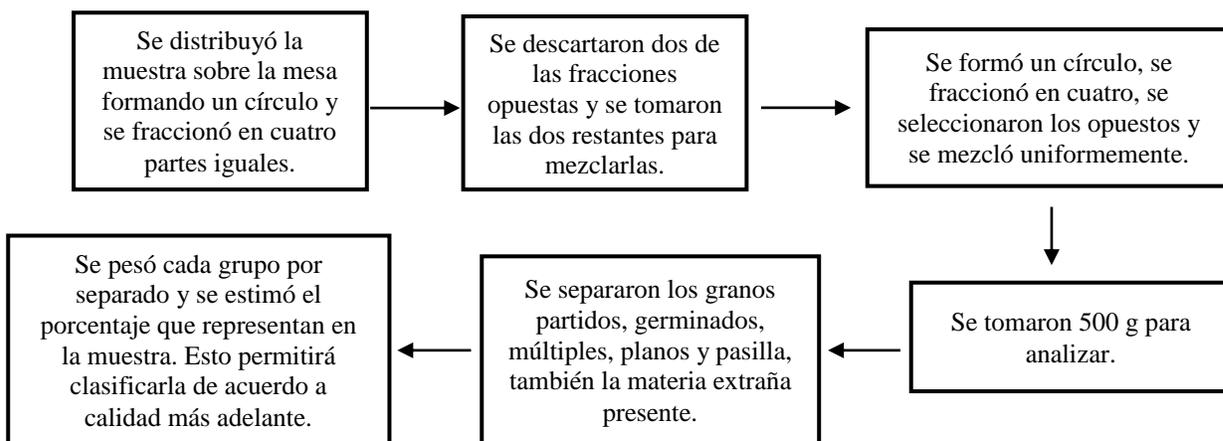
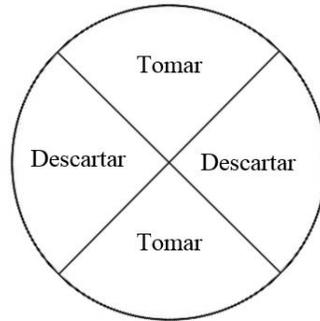


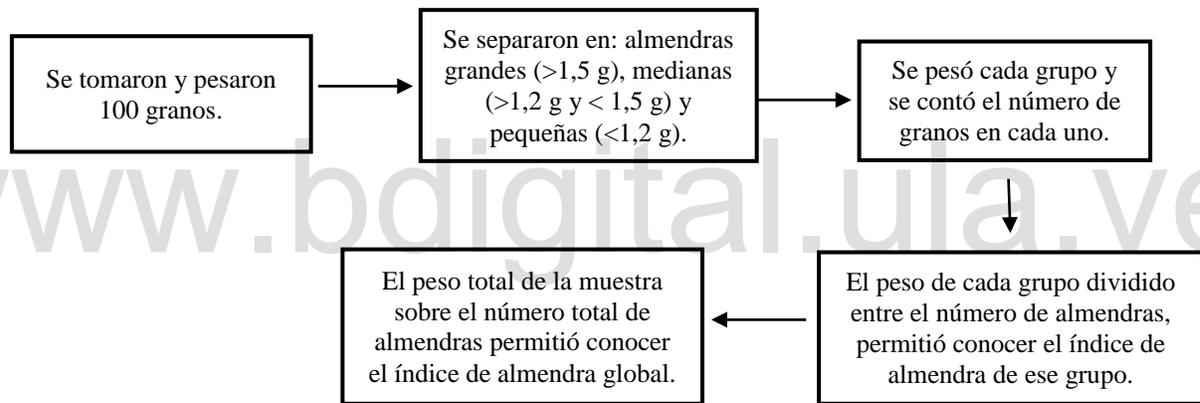
Figura N° 16. Fraccionamiento y análisis preliminar de la muestra.



**Figura N° 17. Ejemplo de cuarteo de la muestra.**

#### 5.4. Índice de almendra

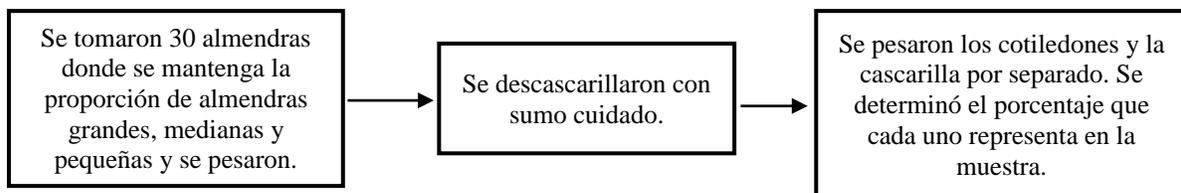
Para conocer el índice de almendra de la muestra analizada (Figura 18), se trazó el siguiente esquema de acuerdo a la propuesta hecha por Ramos *et al.* (2014):



**Figura N° 18. Índice de almendra.**

#### 5.5. Determinación del porcentaje de cascarilla

Acorde al manual de Ramos *et al.* (2014) se propuso el siguiente procedimiento para la determinación de la cascarilla (Figura 19):



**Figura N° 19. Determinación del porcentaje de cascarilla.**

## 5.6. Prueba de corte

La prueba de corte permite determinar el grado de fermentación del cacao, así como el porcentaje de granos mohosos, pizarrosos o dañados por insectos. El procedimiento empleado fue el de la Norma COVENIN 442:1995 detallado en la Figura 20. El resultado obtenido para cada muestra se ejemplifica en la Figura 21, como una representación de la evaluación del proceso postcosecha. En este caso se seleccionó la muestra MC – 18.

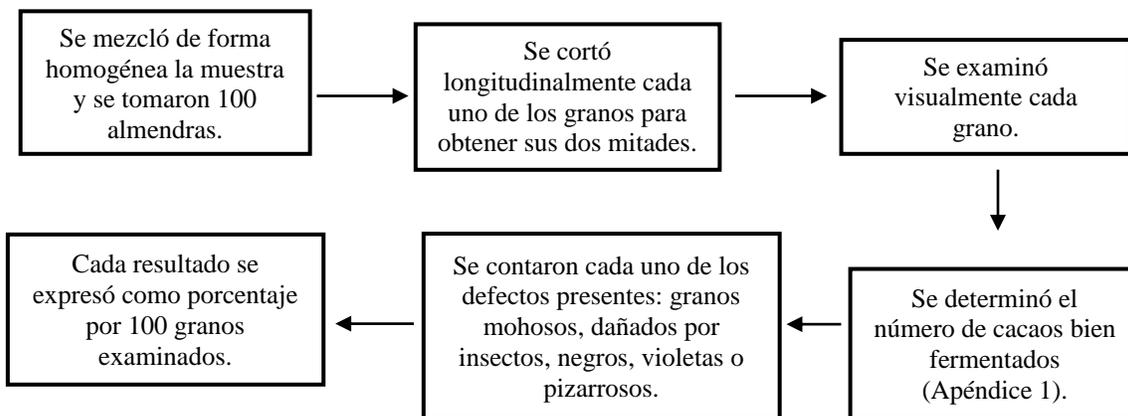


Figura N° 20. Prueba de corte.



Figura N° 21. Prueba de corte de la muestra MC – 18. Fuente: Archivo LIAQIA.

### 5.7. Determinación del contenido de humedad

La humedad del cacao debe estar entre 7 y 8%, por encima de este valor existe un alto riesgo de proliferación de moho. Por el contrario, un porcentaje menor provoca la fragilidad del grano, aumentando la cantidad de granos rotos. Para realizar esta determinación se siguió el protocolo propuesto en la Norma COVENIN 374:1995 (Figura 22):

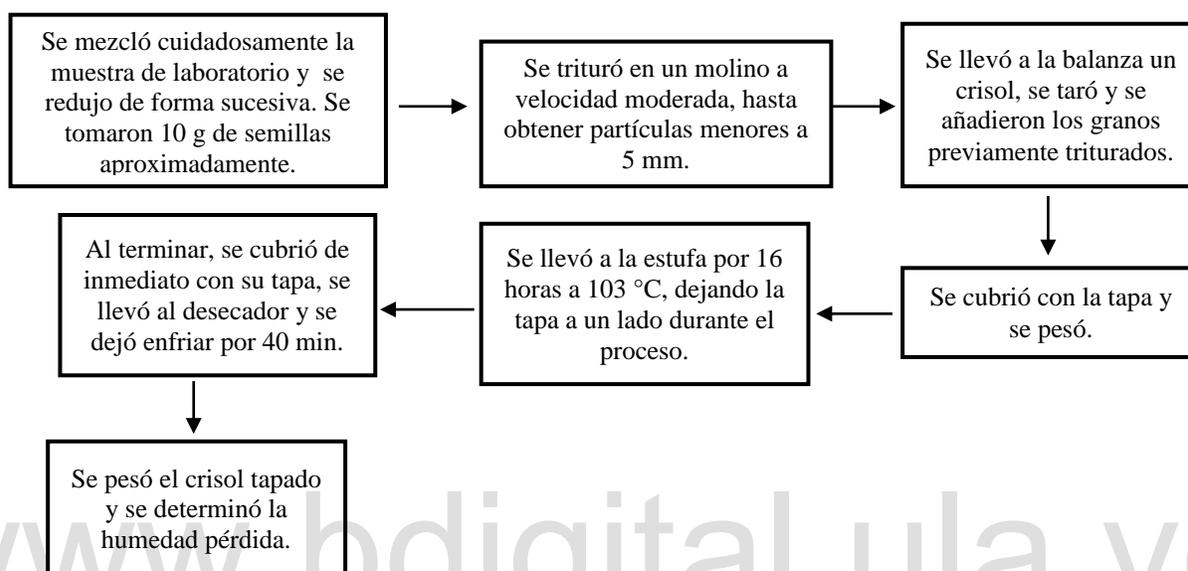
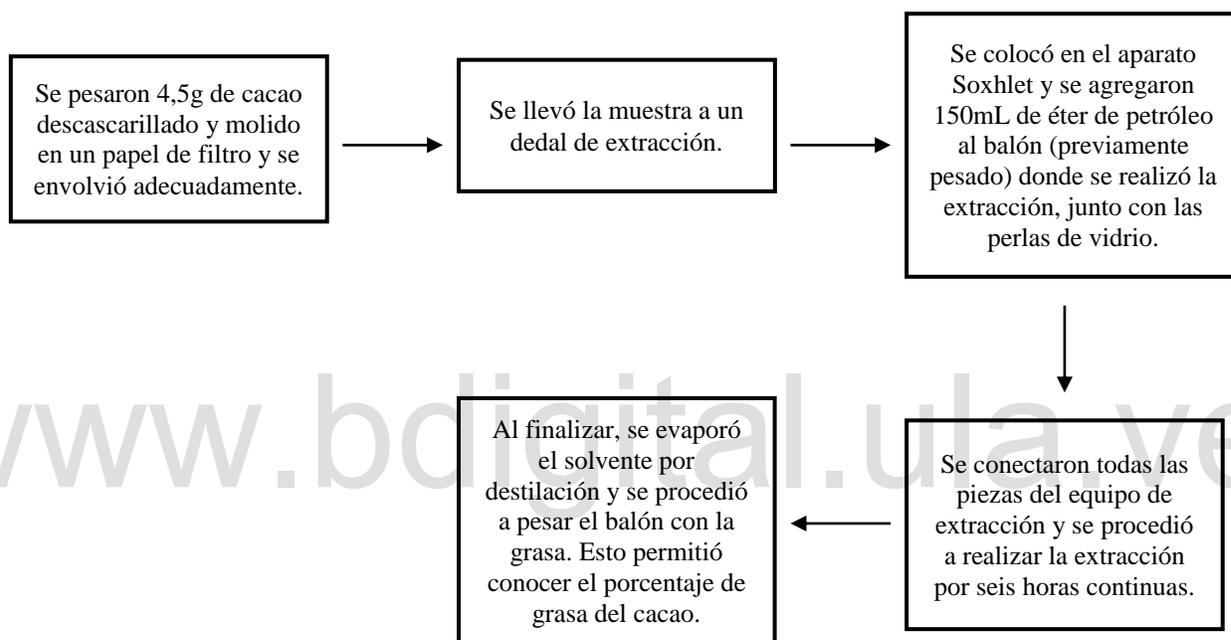


Figura N° 22. Determinación del contenido de humedad.

### 5.8. Determinación de grasa cruda

Para llevar a cabo este análisis, inicialmente se propuso el protocolo establecido por la Norma COVENIN 1340:1995, donde la muestra se hidroliza para extraer la grasa con un aparato Soxhlet. No obstante, el cacao desengrasado que se obtiene a partir de este procedimiento, es empleado más adelante en la determinación de metilxantinas que son extraídas en agua caliente, así como en el análisis del índice de fermentación. Por tanto, la hidrólisis del cacao perjudicaría la medición de los compuestos analizados en las siguientes metodologías y se introduce una modificación al protocolo omitiendo este paso, tal como se describe en la Figura 23. Para verificar que este cambio no afectara de manera significativa la cuantificación de grasa cruda, se hizo una revisión bibliográfica. De acuerdo a Díez (2014), quien hizo un estudio del efecto de la hidrólisis en la medición de grasa cruda en productos como cocoa en

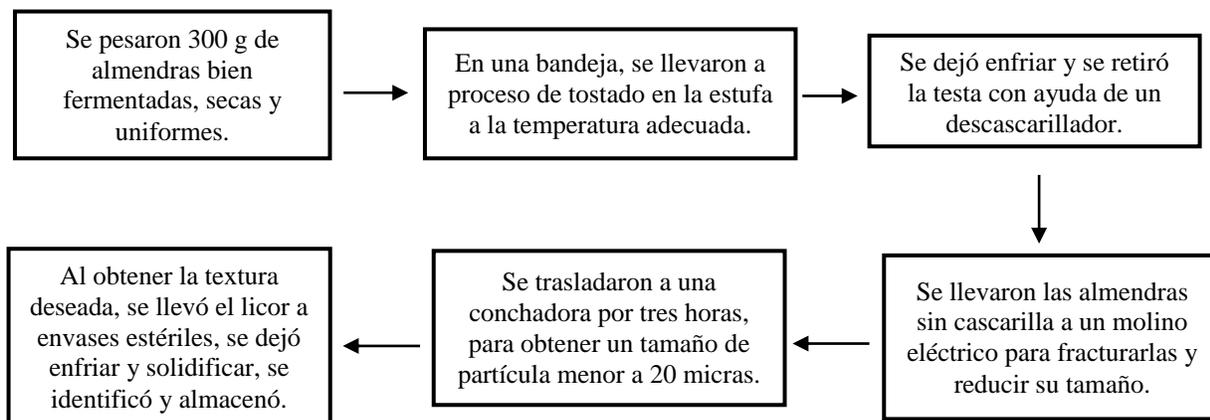
polvo y chocolate instantáneo, ambos subproductos del cacao que se obtienen a partir del prensado del mismo, no existen diferencias significativas para la extracción de grasa con o sin hidrólisis en estas dos matrices. Igualmente, Shin *et al.* (2013) establecen que no existen diferencias significativas en el contenido de grasa analizado de acuerdo a diversos métodos con y sin hidrólisis. En algunos casos el contenido de grasa al usar la hidrólisis es incluso menor que al no usarla, esto debido a la serie de pasos que se introducen. Por tanto, parece factible hacer la corrección al método propuesto inicialmente.



**Figura N° 23. Determinación del contenido de grasa.**

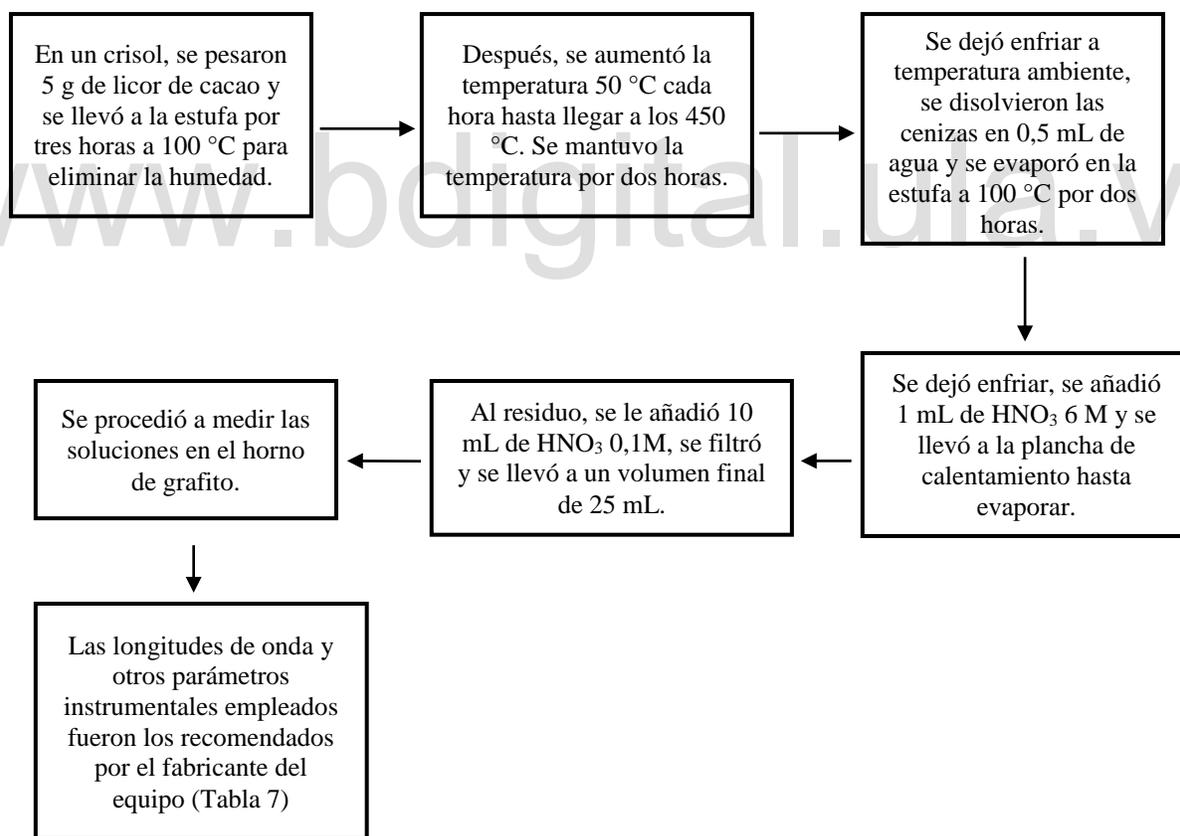
### **5.9. Determinación de metales pesados: cadmio, plomo y arsénico**

En el Método Oficial de la AOAC 999.11. Se emplea licor de cacao, uno de los subproductos del cacao, de manera que se tenga una muestra homogénea y representativa. A continuación se detalla el proceso de preparación de licor de cacao (Figura 24) de acuerdo a Ramos *et al.* (2014), empleado en el análisis:



**Figura N° 24. Preparación del licor de cacao.**

Al tener el licor de cacao preparado, se procedió con el análisis de metales pesados para las muestras de acuerdo a la Figura 25:



**Figura N° 25. Determinación del contenido de cadmio, plomo y arsénico.**

### 5.10. Determinación del contenido de teobromina y cafeína

El método propuesto para conocer las concentraciones de teobromina y cafeína en las muestras de cacao a analizar fue el desarrollado por Brunetto *et al.*, (2007) en su investigación, el cual ya ha sido probado en cacao venezolano y ha dado resultados satisfactorios en la clasificación genotípica del mismo. Sin embargo, al hacer los análisis de las muestras, se realizaron modificaciones al método, omitiendo la fase de lavado en la precolumna y llevando la muestra directamente a la columna analítica, permitiendo disminuir el tiempo de separación y sin afectar la calidad de la determinación. Además, se disminuyó el flujo de la fase móvil para mantener las presiones permitidas por el equipo. A continuación se describen los pasos detallados en la Figuras 26 – 28:

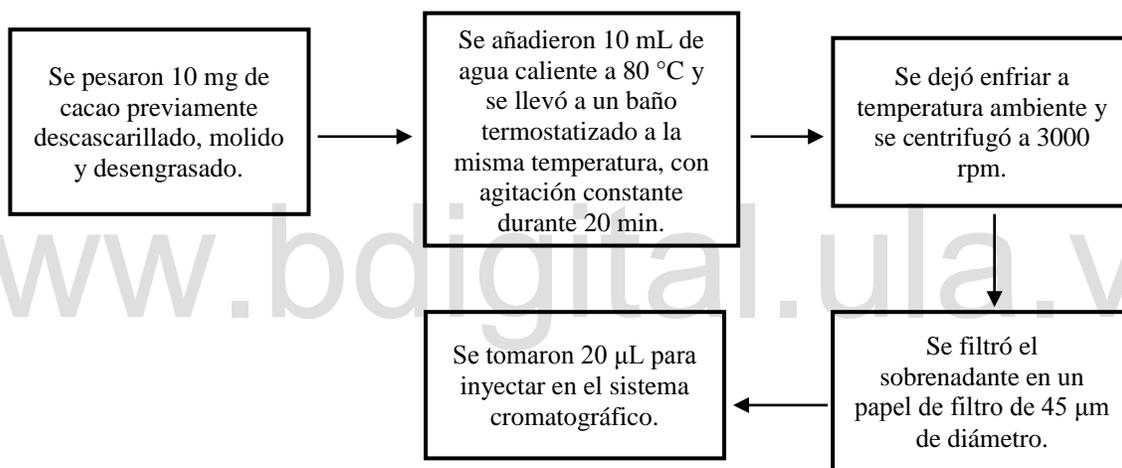


Figura N° 26. Preparación de la muestra.

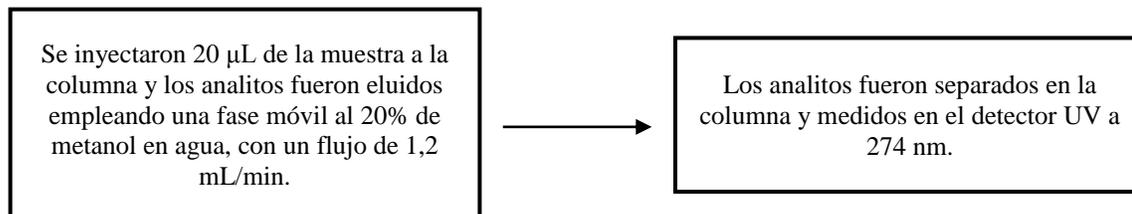


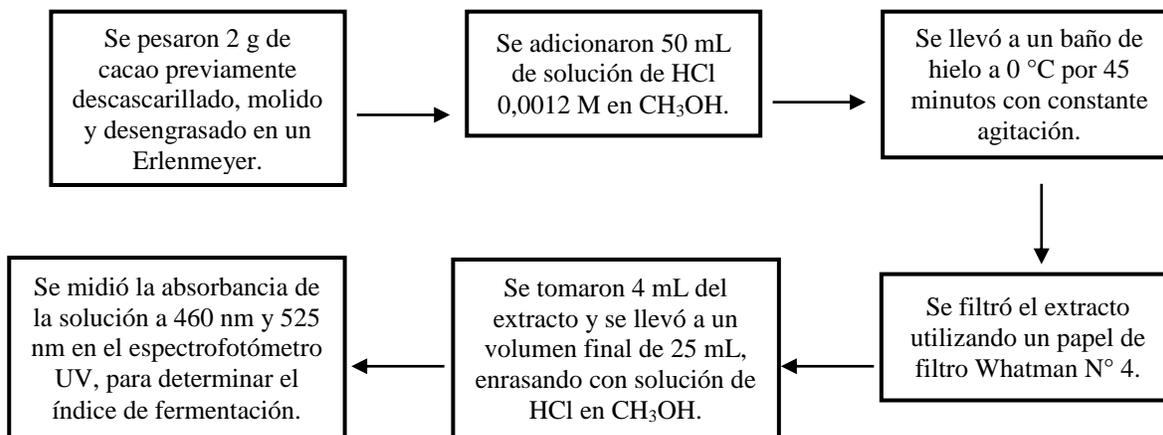
Figura N° 27. Proceso de separación y medición en el sistema cromatográfico.



**Figura N° 28. Equipo cromatográfico Waters Alliance 2690 empleado. Conectado a un módulo detector Waters 996 con arreglo de diodos.**

### **5.11. Determinación del índice de fermentación**

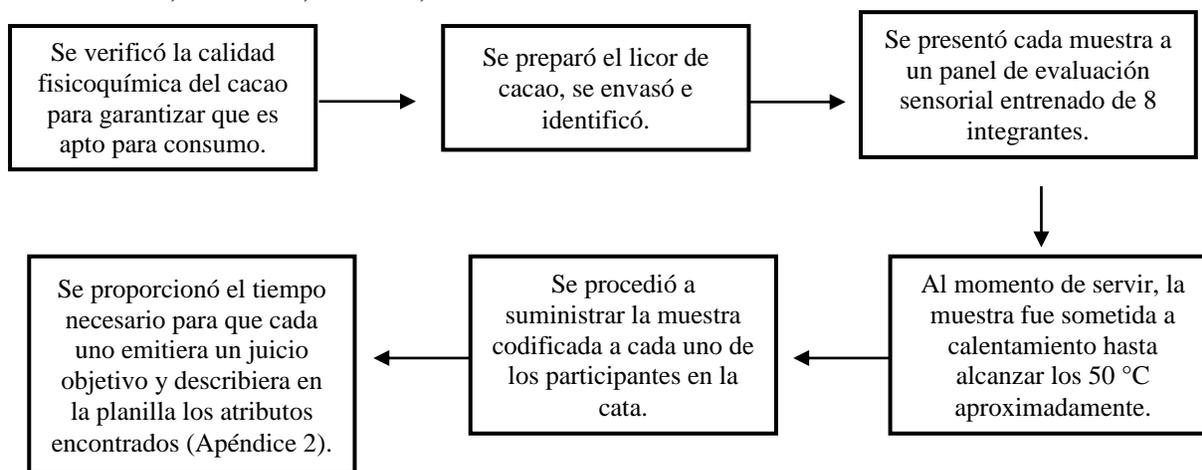
De igual forma, se propuso el siguiente método como un criterio objetivo para definir el grado de fermentación del cacao, también conocido como “color rojo de las almendras” o “red color value”. El mismo es presentado en el manual de análisis de calidad del cacao de Espín y Samaniego (2016), donde se detalla una fermentación adecuada en las almendras de cacao cuando la relación de absorbancia a 460 nm y 525 nm es igual a 1, teniendo a 460 nm los productos de condensación de flavonoides, mientras que a 525 nm se encuentran las antocianinas, un valor de 1 en esta relación indica la finalización de las reacciones de oxidación y condensación de la fermentación. No obstante, la aplicación de este método se ve limitada en cacaos Criollos, dada la falta de antocianinas, por tanto, fue complementado con la prueba de corte previamente detallada. A continuación, se esquematiza la metodología usada (Figura 29):



**Figura N° 29. Procedimiento para la determinación del índice de fermentación.**

### 5.12. Evaluación de las características sensoriales de las muestras

La evaluación debe realizarse sobre las muestras convertidas en licor de cacao, para ello, fueron tostadas a una temperatura y tiempo que benefició y resaltó las características propias de la muestra, y para transformarlas en licor se siguió el procedimiento antes descrito. Para llevar a cabo los análisis de las muestras, se trazó el siguiente procedimiento (Figura 30 y 31), de acuerdo al manual de calidad sensorial de Quintana (2021) donde se describen detalles a tener en cuenta al momento del análisis, además, se propuso emplear los parámetros de evaluación del Comité del Cacao de la Excelencia, para hacer un análisis completo de atributos básicos como el sabor a cacao, la astringencia, amargor y acidez; continuar con el estudio de sabores específicos como los sabores frutales, florales, amaderados y especiados; y finalmente, la mención a sabores y aromas adquiridos o considerados defectos como el sabor verde, ahumado, mohoso, entre otros.



**Figura N° 30. Esquema de trabajo para evaluación sensorial de las muestras.**



Figura N° 31. Rueda de sabores propuesta por el Comité del Cacao de la Excelencia.

## 6. ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 6.1. Recepción de muestras y su distribución geográfica

Inicialmente, se hizo una convocatoria a diversos productores y organizaciones con una amplia trayectoria en la venta y comercialización de cacao a lo largo del país. Se obtuvo una respuesta satisfactoria por parte de la mayoría de empresas convocadas, quienes se comprometieron a participar en este proyecto, siguiendo los lineamientos adecuados. A cada una de las organizaciones interesadas, se le indicó el protocolo expresado en la Figura 1 para la toma de muestra y éstas se encargaron del almacenamiento y transporte de su respectiva muestra hasta las instalaciones del laboratorio de análisis.

Esta invitación permitió obtener una serie de muestras de cacao de diversas regiones del país, cubriendo así, la zona Occidental, Central y Oriental de Venezuela, tal como se observa en el mapa que se presenta en la Figura 32.

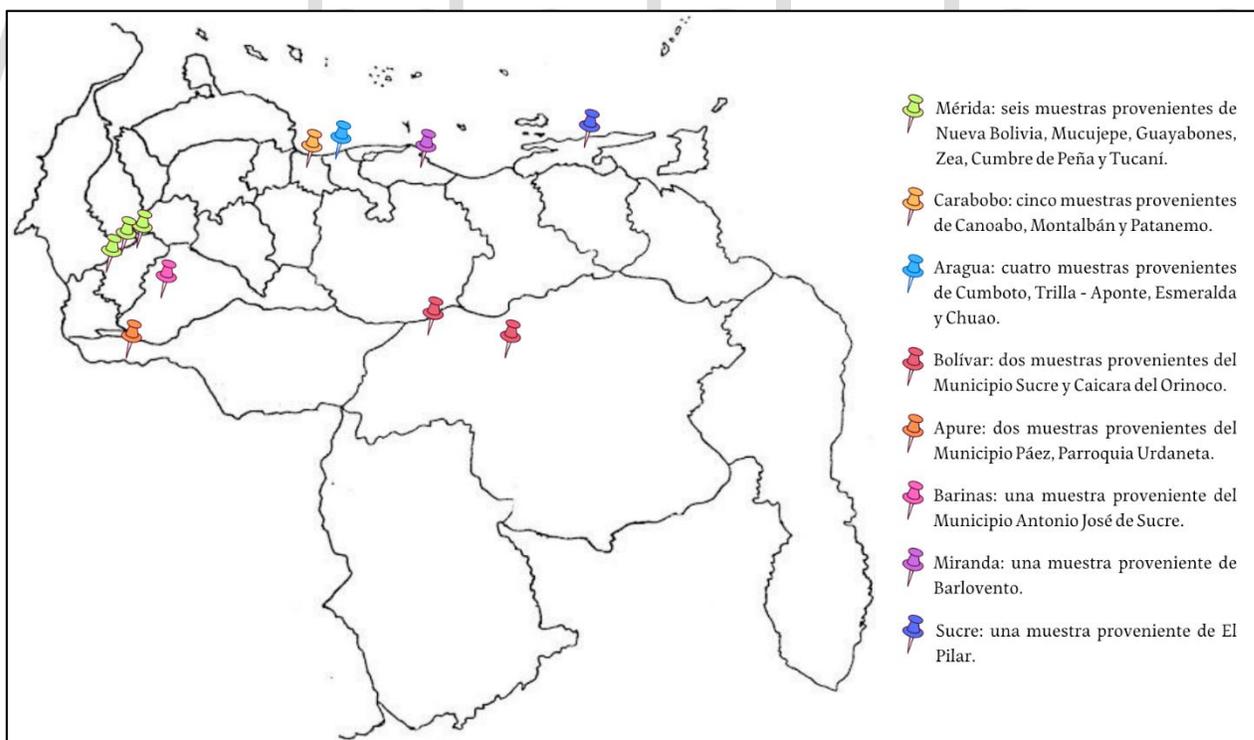


Figura N° 32. Mapa de Venezuela con ubicaciones de las muestras analizadas.

Tras haber recibido una totalidad de 22 muestras para su respectivo análisis, se presentan los códigos asignados por el orden de recepción, así como otros datos pertinentes para mantener la trazabilidad del producto (Tabla 4). Los códigos de color asignados a las muestras, fueron seleccionados de las tablas Munsell para tejido vegetal, descritos por su color, matiz, valor de brillo y chroma o saturación.

**Tabla N° 4. Datos de la recepción de muestras.**

Muestra	Lugar de procedencia	Productor / Organización	Fecha de recepción	Olor	Color	Textura
MC - 01	Nueva Bolivia, estado Mérida	La Palma, Sur del Lago	28-10-2021	Característico de cacao	Rojo amarillento 5YR 5/6	Lisa
MC - 02	Mucujepe, estado Mérida	Finca Pan y Amor	29-10-2021	Característico de cacao	Marrón rojizo oscuro 2.5YR 3/4	Semirugosa
MC - 03	Sur del Lago, Sector Guayabones, estado Mérida	Agroimportaciones Occidente	08-11-2021	Ácido acético	Rojo oscuro 2.5YR 3/2	Lisa
MC - 04	Municipio Antonio José de Sucre, estado Barinas	Finca Alejandros	23-11-2021	Característico de cacao	Marrón rojizo oscuro 2.5YR 3/4	Semilisa
MC - 05	Canoabo, estado Carabobo	Hacienda San Cayetano	06-12-2021	Característico de cacao	Rojo 10R 4/6	Semirugosa
MC - 06	Canoabo, estado Carabobo	Hacienda San Cayetano	06-12-2021	Característico de cacao	Marrón rojizo oscuro 2.5YR 3/4	Semirugosa
MC - 07	Caño Tigre, Zea, estado Mérida	Finca El Suspiro	13-12-2021	Ácido acético	Rojo oscuro 2.5YR 3/2	Semilisa
MC - 08	Montalbán, estado Carabobo	Hacienda El Recreo	12-01-2022	Fresco, fermentado	Rojo muy oscuro 2.5YR 2.5/2	Semilisa
MC - 09	Cumbre de Peña, estado Mérida	Ramón Alexis Gutiérrez / Agroasunca	25-01-2022	Característico de cacao	Negro 5YR 2.5/1	Lisa
MC - 10	Comunidad Idicuoto Alto Suapure, Caicara del Orinoco, estado Bolívar	Jesús Enrique Macabril	27-01-2022	Frutal	Gris rosáceo 5YR 6/2	Semilisa
MC - 11	Barlovento, estado Miranda	Xocolatl Trading	27-01-2022	Característico de cacao	Rojo amarillento 5YR 5/6	Lisa
MC - 12	Tucaní, Sur del Lago, estado Mérida	Xocolatl Trading	27-01-2022	Característico de cacao	Rojo oscuro 10R 3/6	Semilisa
MC - 13	Cumboto, estado Aragua	Fundo Cacao C.A.	27-01-2022	Característico de cacao	Rojo muy oscuro 10R 2.5/2	Semirugosa
MC - 14	Trilla Aponte, estado Aragua	Fundo Cacao C.A.	27-01-2022	Ácido acético	Rojo oscuro 2.5YR 3/2	Lisa
MC - 15	Esmeralda, estado Aragua	Fundo Cacao C.A.	27-01-2022	Ácido acético	Rojo amarillento 5YR 4/6	Semirugosa
MC - 16	El Pilar, estado Sucre	Hacienda San José	07-02-2022	Característico de cacao	Rojo oscuro 10R 3/6	Semilisa
MC - 17	Municipio Páez, Parroquia Urdaneta, estado Apure	Wilmer Kattah / Hacienda Brisas del Sarare	07-02-2022	Frutal	Rojo amarillento 5YR 4/6	Semirugosa
MC - 18	Montalbán, estado Carabobo	Hacienda El Recreo	12-01-2022	Levaduras, fermentado	Marrón rojizo 2.5YR 3/4	Rugosa
MC - 19	Municipio Páez, Parroquia Urdaneta, estado Apure	Wilmer Kattah / Hacienda Brisas del Sarare	18-05-2022	Ácido acético	Rojo débil 10R 4/4	Rugosa
MC - 20	Patanemo, estado Carabobo	Cacao San Francisco	14-06-2022	Frutal	Rojo 10R 4/6	Lisa
MC - 21	Chuao, estado Aragua	Empresa campesina de Chuao / Chuao Trading	04-07-2022	Frutal	Rojo oscuro 10R 3/3	Semilisa
MC - 22	Municipio Sucre, estado Bolívar	Alber Gorrin / Finca Santa Sofía	12-08-2022	Frutal	Rojo 2.5YR 4/6	Semilisa

## 6.2. Análisis de parámetros físicos

Al momento del ingreso de la muestra, se determinó la humedad por medio de un higrómetro, hallando así los siguientes resultados (Figura 33). En este gráfico, estos datos son comparados con los límites establecidos en la norma COVENIN 50:1995 y su revisión, aún no publicada del 2018.

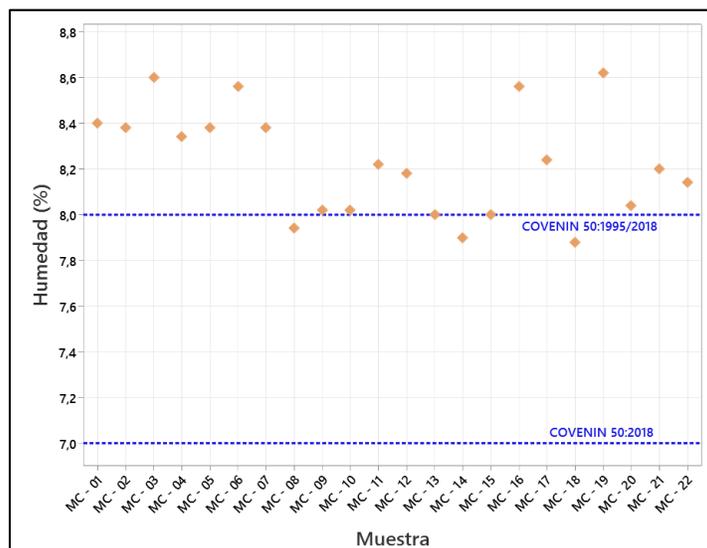


Figura N° 33. Valores de humedad medidos con el medidor de humedad.

Esta determinación fue repetida siguiendo el método propuesto en la Norma COVENIN 374:1995, tal como se describió en la Figura 10, encontrando así nuevos valores que pudieron ser comparados con los estándares de 7 y 8% (Figura 34):

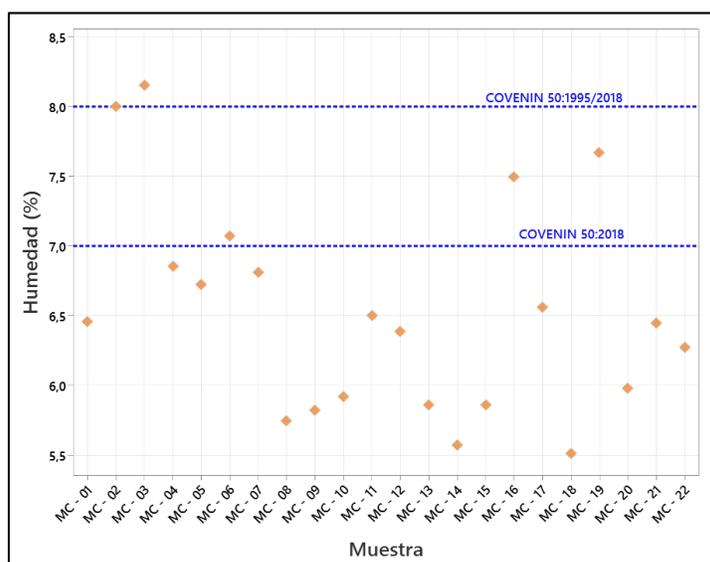


Figura N° 34. Valores de humedad medidos de acuerdo a la Norma COVENIN.

Tal como se observa, la mayoría de los valores encontrados usando el medidor de humedad, son superiores al 8% regulado por la Norma COVENIN 50:1995. Es importante acotar que este tipo de equipos son altamente usados en campo, como una alternativa que permite la toma de decisiones inmediata en los procesos postcosecha. No obstante, los resultados obtenidos en las Figuras 33 y 34, reflejan la importancia que ofrece realizar la determinación siguiendo un protocolo oficial estandarizado.

En los resultados obtenidos mediante el protocolo de la Norma COVENIN 374:1995, es notorio que si solo se considera la regulación de 1995 que establece como límite superior un 8% de humedad, solo la muestra MC – 03 proveniente del Sector Guayabones en la zona del Sur del Lago, estaría por encima de este límite. Siendo ésta más propensa que las demás a ser colonizada por hongos, bacterias e insectos.

De ser aprobada la revisión de 2018, cuatro de las muestras analizadas tendrían los niveles óptimos de humedad, lo cual permite asegurar la inocuidad del producto final, así como la permanencia de los sabores y olores característicos del cacao. Por otra parte, en aquellos cacaos que se encuentran por debajo de 6%, si bien este porcentaje no presenta un problema inmediato en la muestra, puede hacerlos más propensos a romperse durante el transporte y almacenamiento, dejándolos más susceptibles a contaminaciones.

Además, CAOBISCO (2015) comenta que esto podría generar un aumento de los ácidos grasos libres en el cacao. De acuerdo a estudios realizados, se ha observado un incremento de las concentraciones de los mismos en muestras de cacao que han sufrido pérdidas de su integridad física, aumentando la lipólisis en los granos. Este es un defecto grave que reduce el valor económico de los granos de cacao y al mismo tiempo, un factor que puede afectar la salud de quienes consumen el cacao, debido a que los ácidos grasos libres generan un aumento en la concentración de hormonas encargadas de la regulación de azúcar en sangre.

De igual forma, la Norma COVENIN 50:1995 y su revisión del 2018, hace uso de una serie de parámetros físicos estipulados que permiten clasificar las muestras de cacao como extrafino, fino de primera y fino de segunda. Siguiendo la metodología de fraccionamiento y

análisis preliminar, junto con la metodología de la prueba de corte expuestas previamente, fue posible determinar los porcentajes de atributos o defectos físicos que permiten asignar una clasificación a cada muestra, a continuación se esquematizan los resultados de este análisis (Tablas 5 y 6):

**Tabla N° 5. Resultados del fraccionamiento y análisis preliminar.**

Muestra	Granos partidos (%)	Granos germinados (%)	Granos múltiples (%)	Granos planos (%)	Pasilla (%)	Materia extraña (%)
MC - 01	(1,736 ± 0,003)	(0,647 ± 0,001)	(1,729 ± 0,003)	(0,866 ± 0,002)	(0,869 ± 0,002)	(0,3263 ± 0,0006)
MC - 02	(3,56 ± 0,01)	(2,336 ± 0,009)	(2,455 ± 0,009)	(0,417 ± 0,002)	(0,477 ± 0,002)	(0,331 ± 0,001)
MC - 03	(5,46 ± 0,01)	(2,702 ± 0,006)	(0,585 ± 0,001)	(0,310 ± 0,007)	(0,3538 ± 0,0008)	(0,443 ± 0,002)
MC - 04	0	(0,793 ± 0,001)	(0,701 ± 0,001)	(0,3394 ± 0,0006)	(0,1559 ± 0,0003)	0
MC - 05	(1,180 ± 0,002)	(2,226 ± 0,005)	(1,063 ± 0,002)	(0,3864 ± 0,0007)	(1,213 ± 0,002)	(0,481 ± 0,001)
MC - 06	(0,2549 ± 0,0006)	(0,462 ± 0,001)	(0,912 ± 0,002)	0	(2,476 ± 0,006)	0
MC - 07	(0,754 ± 0,001)	(0,909 ± 0,002)	(0,2858 ± 0,0005)	0	(2,708 ± 0,005)	(0,2577 ± 0,0005)
MC - 08	(0,447 ± 0,001)	0	(0,639 ± 0,002)	0	(0,2725 ± 0,0007)	0
MC - 09	(0,620 ± 0,001)	(0,841 ± 0,002)	(0,889 ± 0,002)	0	(0,1062 ± 0,0002)	0
MC - 10	0	(1,684 ± 0,003)	(0,3047 ± 0,0006)	0	(0,937 ± 0,002)	0
MC - 11	(0,637 ± 0,002)	0	(1,122 ± 0,003)	(0,3168 ± 0,0008)	(1,449 ± 0,004)	(0,2350 ± 0,0006)
MC - 12	(1,008 ± 0,002)	(0,627 ± 0,002)	(1,529 ± 0,004)	0	(7,50 ± 0,02)	(0,555 ± 0,001)
MC - 13	0	(1,137 ± 0,002)	(0,2742 ± 0,0005)	0	0	0
MC - 14	0	(1,445 ± 0,003)	(0,732 ± 0,001)	0	(0,550 ± 0,001)	0
MC - 15	0	(1,427 ± 0,003)	(0,728 ± 0,001)	0	(2,637 ± 0,005)	0
MC - 16	(0,1211 ± 0,0002)	(0,4320 ± 0,0009)	(1,378 ± 0,003)	0	(6,80 ± 0,01)	0
MC - 17	(0,2373 ± 0,0008)	(0,594 ± 0,002)	0	0	(1,063 ± 0,004)	0
MC - 18	0	(0,2432 ± 0,0009)	0	0	(1,383 ± 0,005)	0
MC - 19	(0,644 ± 0,002)	0	0	0	(1,591 ± 0,006)	0
MC - 20	0	0	0	0	(1,545 ± 0,003)	0
MC - 21	(1,201 ± 0,004)	(0,810 ± 0,002)	0	0	(5,84 ± 0,02)	0
MC - 22	0	(0,512 ± 0,001)	(0,831 ± 0,002)	0	(3,551 ± 0,008)	0

**Tabla N° 6. Resultados de la prueba de corte.**

Muestra	F (%)	P (%)	Pz (%)	M (%)	I (%)	N (%)	V (%)
MC - 01	36	62	2	0	0	1	0
MC - 02	73	27	0	0	2	0	0
MC - 03	58	41	1	0	0	0	0
MC - 04	53	44	3	1	6	0	0
MC - 05	63	37	0	0	0	0	0
MC - 06	75	24	1	0	0	0	0
MC - 07	46	47	7	0	0	0	9
MC - 08	84	16	0	0	0	0	0
MC - 09	67	32	1	2	0	0	0
MC - 10	49	44	7	2	1	0	4
MC - 11	66	33	1	2	1	0	3
MC - 12	63	36	1	1	0	0	3
MC - 13	74	24	2	0	2	0	1
MC - 14	71	27	2	0	1	0	2
MC - 15	63	34	3	1	0	0	0
MC - 16	72	26	2	1	1	0	1
MC - 17	62	37	1	1	4	0	0
MC - 18	74	24	2	0	1	0	5
MC - 19	42	54	4	0	0	0	0
MC - 20	63	37	0	0	0	0	0
MC - 21	62	34	4	0	1	0	0
MC - 22	59	34	7	0	4	0	1

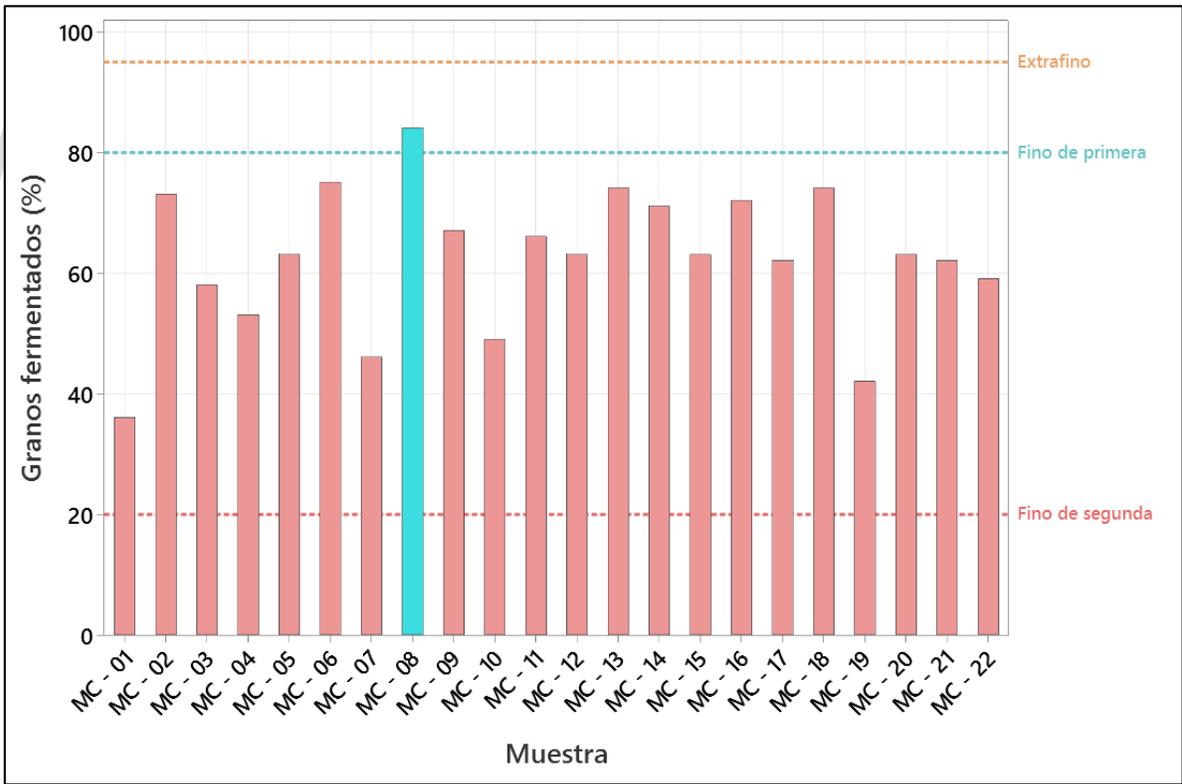
F: Cacaos bien fermentados. P: Cacaos parcialmente fermentados. Pz: Cacaos pizarrosos. M: Cacaos mohosos. I: Cacaos infectados por insectos. N: Cacaos negros. V: Cacaos violetas.

Al comparar los resultados obtenidos en las Tablas 5 y 6 con la norma, estos indican una baja presencia de granos mohosos, germinados y múltiples en todas las muestras, lo cual les permitiría calificar como cacaos extrafinos o finos de primera. En cuanto a la cantidad de materia extraña, la mayor parte de las muestras no exceden el límite máximo permitido de 0,5%, solo la muestra MC – 12 excede este valor y por tanto, solo se realizaron sus análisis físicos, pero no fue considerada en los análisis posteriores.

No obstante, la norma establece un límite máximo permitido para una suma de defectos donde se engloba parámetros como granos partidos, dañados por insectos, planos, pizarrosos y negros. Al verificar éstos, la muestra MC – 04 excede el límite máximo permitido para

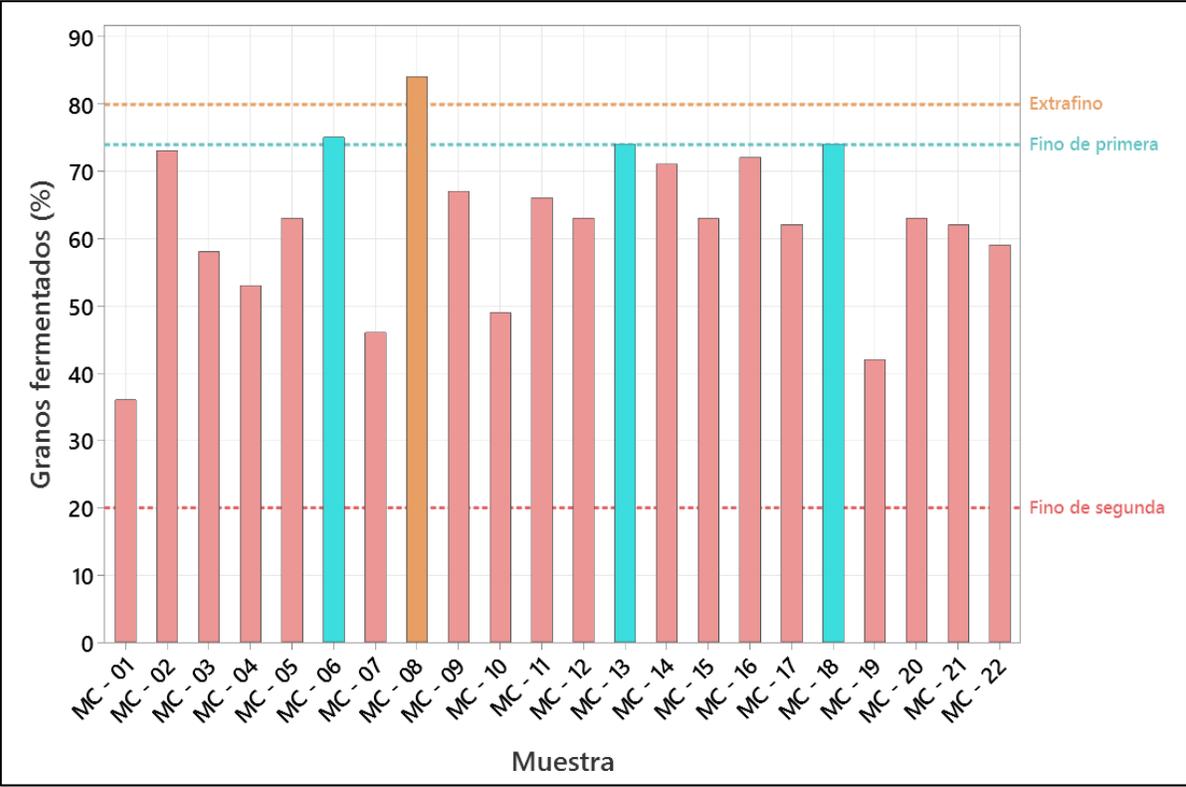
cacaos finos de segunda, quedando por debajo de esta clasificación y siendo descartada para análisis posteriores. La mayor parte de las muestras califican como cacaos finos de segunda, solo conservando características de cacao extrafino y fino de primera, 9 de las 22 muestras analizadas.

Pero, a pesar de calificar de forma adecuada en cuanto a no exceder ciertos defectos, el parámetro con más peso al momento de clasificar las muestras termina siendo el porcentaje de fermentación. De acuerdo a la Norma COVENIN 50:1995, los cacaos analizados serían clasificados como se observa en la Figura 35, siendo requisito tener al menos un 20% de fermentación para que clasifiquen como cacaos finos de segunda, y un porcentaje de 80% para clasificar como cacaos finos de primera. Tal como se observa, ninguna de las muestras alcanza el requisito mínimo de 95% para cacaos extrafinos.



**Figura N° 35. Clasificación del cacao con base al porcentaje de fermentación según la Norma COVENIN 50:1995.**

Por otra parte, si se toma en consideración la revisión de 2018 de esta norma (Figura 36), donde los porcentajes de clasificación para cada tipo de cacao han sido modificados, se obtendría una muestra de cacao extrafino, tres muestras de cacao fino de primera y dieciocho muestras de cacao fino de segunda.



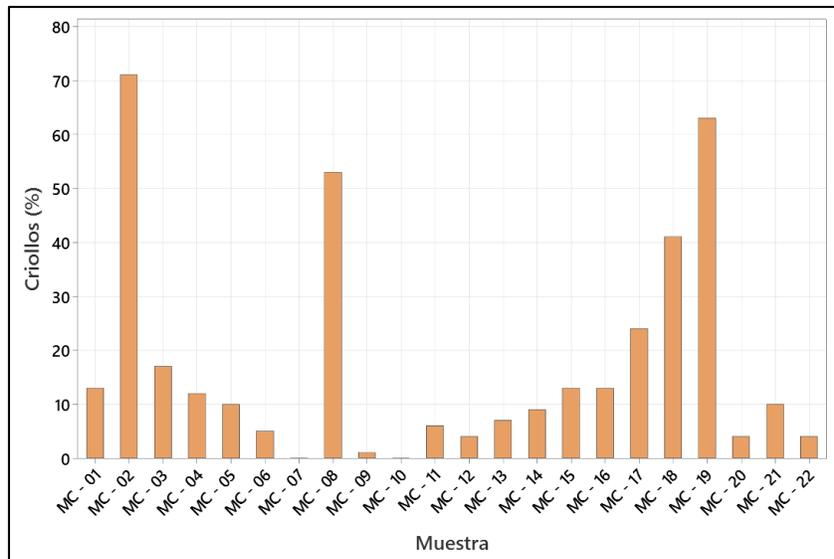
**Figura N° 36. Clasificación del cacao con base al porcentaje de fermentación según la Norma COVENIN 50:2018.**

El porcentaje de fermentación es un factor que refleja la eficiencia del proceso de fermentación y permite destinar cada lote de cacao a un mercado o comprador en particular. Este es un proceso que suele durar de tres a ocho días dependiendo de las condiciones climáticas y ubicación geográfica. Al someter los granos al proceso fermentativo, la pulpa de la mazorca actúa como sustrato de la fermentación, ya que en su composición se encuentran azúcares (principalmente glucosa y fructosa) y ácido cítrico, haciéndola un medio ideal para el crecimiento bacteriano.

Además, al culminar esta etapa, se observa un aumento en la acidez posiblemente debido a la formación de ácido butírico, isobutírico e isovalérico, pero es el ácido acético quien se forma en mayor proporción, conformando hasta un 90% del total de ácidos. Este compuesto tiene un papel importante, ya que funciona como catalizador en las reacciones enzimáticas que producen los compuestos que desarrollan características sensoriales deseables en el cacao. Posterior a esto, se somete a una etapa de secado que permite reducir el porcentaje de humedad y los ácidos volátiles remanentes, esto con el fin de detener reacciones indeseables y de oxidación de polifenoles (Afoakwa, 2014).

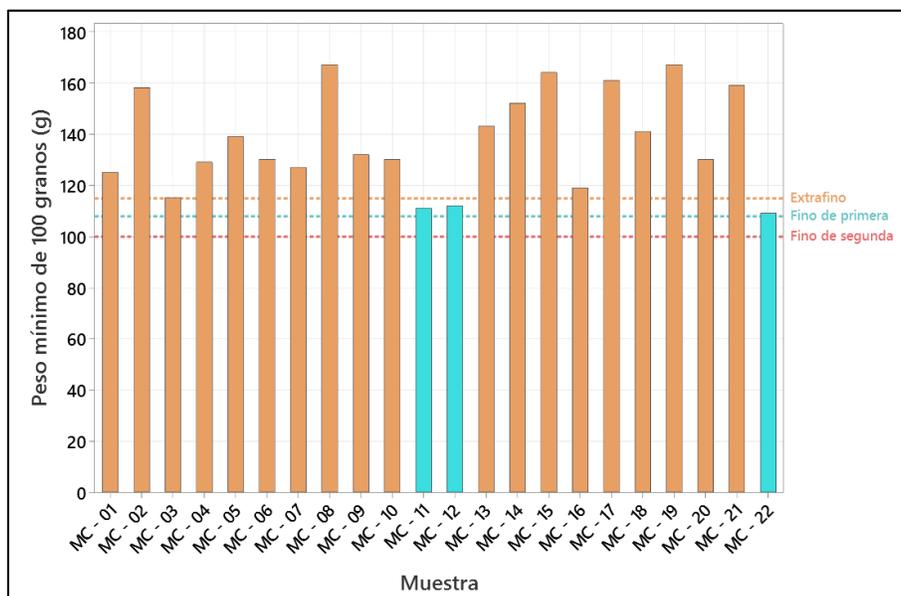
La fermentación puede llevarse a cabo de acuerdo a diversos métodos como la fermentación en montón, en cajas de madera o en bandejas. El estudio de este atributo en la presente investigación, indica que este es un parámetro que aún necesita de un mayor control durante los procesos postcosecha en las fincas. Así como también, una concientización a los productores que no fermentan su cacao, para encontrar un método de fermentación que se adapte a sus posibilidades y que además, les permita aumentar la calidad y resaltar las cualidades sensoriales de los materiales genéticos que tienen en sus centrales de producción, reflejándose en un mayor valor económico de sus cacaos.

Otro factor analizado mediante la prueba de corte fue el porcentaje de granos Criollos en la muestra. Éste no es regulado por la norma, sin embargo, es una característica importante que ofrece un indicio de los atributos sensoriales que se encuentran dentro de la muestra (Figura 37). Tal como se observa, se tendrían cinco muestras con una tendencia altamente Criolla, mientras que el resto de las muestras analizadas posiblemente provengan de la variedad Trinitaria o Forastera, factor que será analizado más adelante mediante las determinaciones de teobromina y cafeína por HPLC.



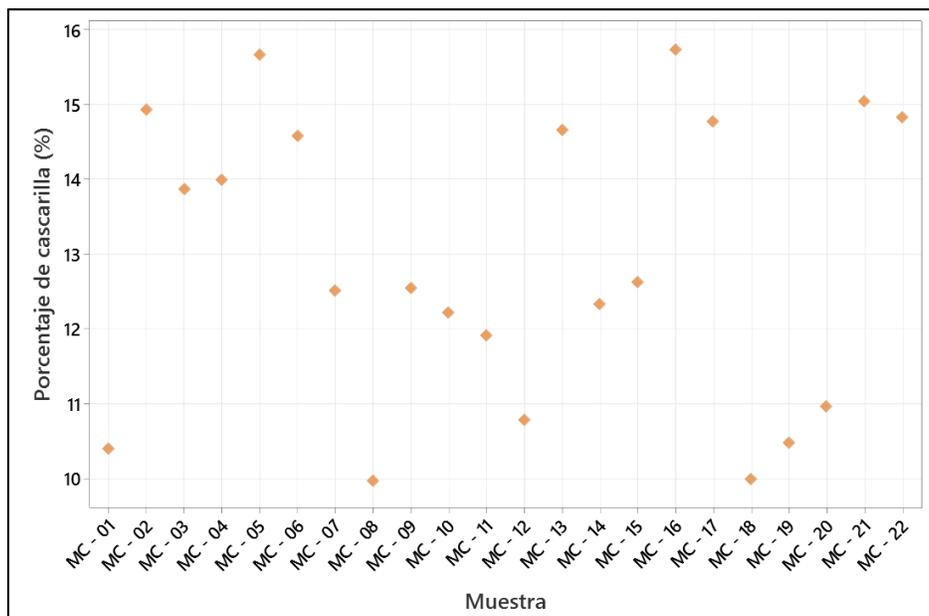
**Figura N° 37. Porcentaje de granos criollos en las muestras analizadas.**

En cuanto a la metodología de índice de almendra, fue posible conocer el peso de 100 almendras y comparar los resultados con las estipulaciones que hace la norma (Figura 38). Como se puede observar, tres de las muestras analizadas poseen un peso superior a 108 g y el resto de ellas, un valor superior a 115 g. Este factor es de gran importancia ya que permite estimar los rendimientos y aprovechamiento que tendrá una muestra de cacao al momento de ser procesada. Los resultados obtenidos reflejan que todas las muestras analizadas tendrían un alto rendimiento a nivel de la industria, lo que favorece a sus compradores y por lo tanto, podría beneficiar el precio en el mercado de estos cacaos.



**Figura N° 38. Clasificación del cacao con base al peso mínimo de 100 granos.**

Siguiendo el protocolo trazado para porcentaje de cascarilla, se encontró la siguiente distribución de las muestras (Figura 39).



**Figura N° 39. Porcentaje de cascarilla de las muestras.**

Como se indica en la Figura 39, se encuentra un grupo de cacaos con porcentajes que van desde 11 hasta 13% de cascarilla en el grano, de acuerdo a la bibliografía (CAOBISCO, 2015 y Quintana, 2021) este es un porcentaje óptimo para los granos de cacao. Se observa otro grupo de muestras con porcentajes mayores a 14%, que si bien indica una mayor protección al grano por el grosor de la cascarilla, también representa un menor rendimiento de material comestible durante el proceso de transformación, por tanto, un valor económico inferior. Por otra parte, se halla un grupo de cacaos con porcentajes menores al 11%, a nivel comercial son altamente deseados este tipo de cacaos, ya que aporta un alto rendimiento comestible, sin embargo, existe el riesgo de fragilidad en los granos de estas muestras.

En la determinación de grasa cruda de acuerdo a la Norma COVENIN 1340:1995, se encontraron los siguientes valores para cada una de las muestras (Figura 40). La cantidad y calidad de la grasa de cacao es un factor importante en la elaboración de chocolates, el rendimiento de la misma influye en el precio a pagar por un cacao en particular (CAOBISCO, 2015). En la investigación realizada por Pontillon (1997) se encontraron porcentajes de grasa que van desde 43 hasta 47% en cacaos provenientes de países de África y también de Ecuador

y Brasil. No obstante, en este estudio señala que estos valores solo deben ser considerados como indicadores, ya que los mismos pueden cambiar notablemente debido a variaciones estacionales, ubicación geográfica y genética del cacao.

En el análisis realizado en laboratorio, se encontraron valores que van desde 44,1 hasta 56,8%. Siendo este un parámetro que permite a la industria decidir si un cacao cumple con los requisitos de materia prima necesarios para los productos que desean elaborar, ya que variaciones en el contenido de grasa influyen en la cristalización al momento de temperar un chocolate. No obstante, es importante recalcar que el temperado depende de una gama de condiciones que deben ser ajustadas de manera óptima, y al encontrar la combinación adecuada de temperaturas, se puede inducir la formación de polimorfos estables en la grasa.

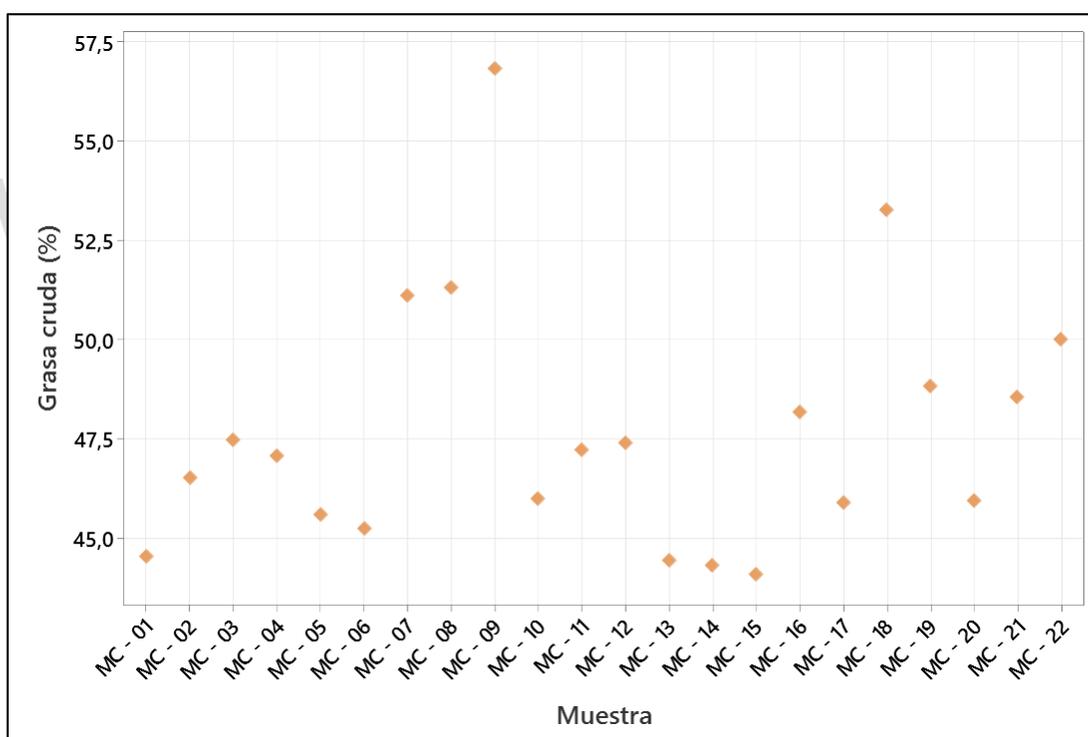


Figura N° 40. Porcentaje de grasa cruda de las muestras.

### 6.3. Análisis de los contenidos de cadmio, plomo y arsénico en las muestras

La determinación de las concentraciones de cadmio, plomo y arsénico en las muestras de licor de cacao analizadas requirió el uso de parámetros adecuados para el equipo de absorción atómica por atomización electrotérmica de marca Perkin – Elmer modelo AAnalyst 600 con

automuestreador AS – 800. Para esto, se emplearon las recomendaciones del fabricante y los parámetros de rutina empleados en el análisis de metales con este equipo en el Laboratorio de Espectroscopia Molecular de la Universidad de Los Andes (Tabla 7).

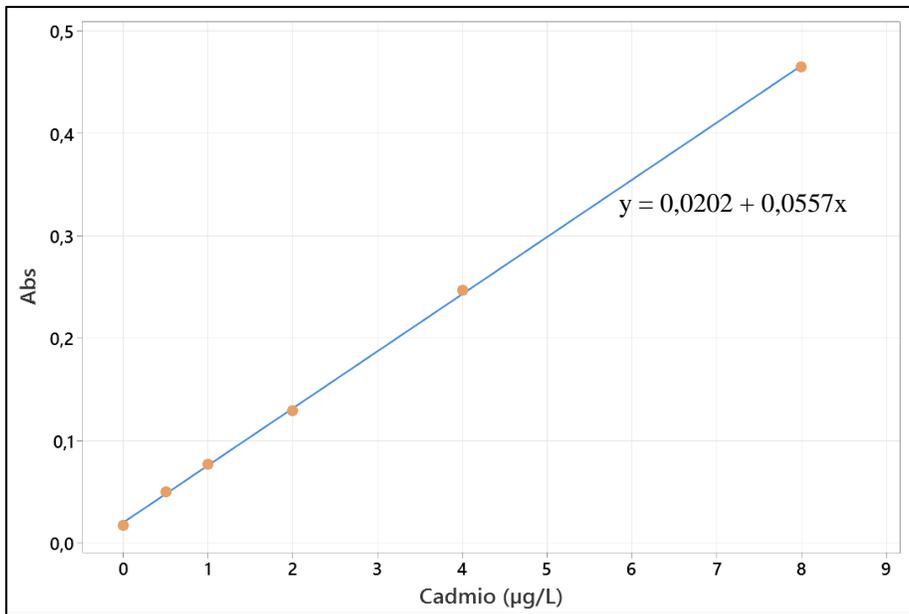
La exactitud y la precisión de los métodos han sido establecidas previamente por medio de medidas repetidas del blanco y la realización de estudios de recuperación, ambos necesarios para la determinación de estos metales en el trabajo rutinario de este laboratorio. Además, estos fueron confirmados con las curvas de calibración empleadas en la presente investigación (Tabla 8, Figuras 41 – 43).

**Tabla N° 7. Parámetros empleados en el Espectrómetro de absorción atómica Perkin Elmer AAnalyst 600.**

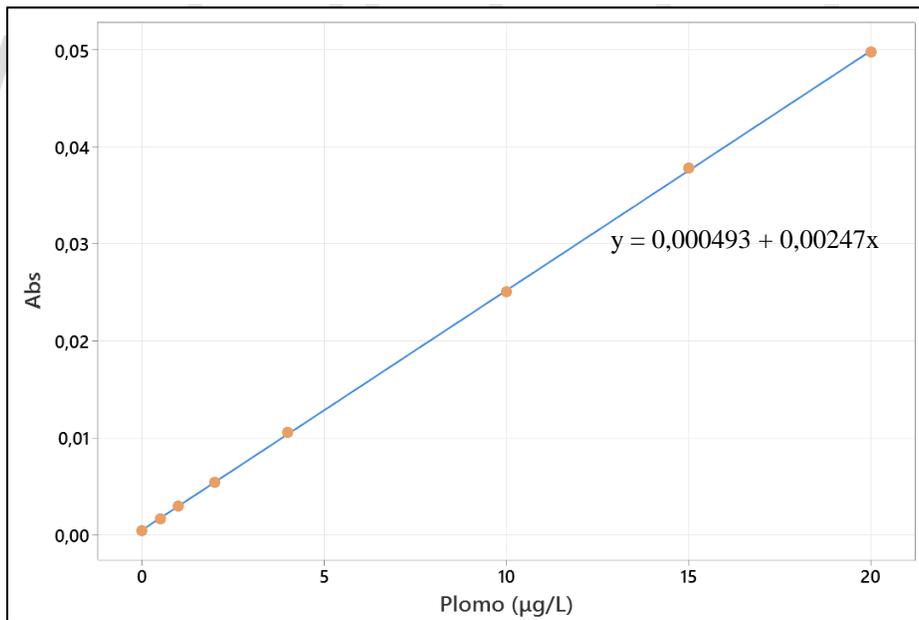
Parámetros	Determinación de cadmio	Determinación de plomo	Determinación de arsénico
Fuente	Lámpara de cátodo hueco		
Corriente de la lámpara	7 mA	10 mA	10 mA
Modo de medida	Área de pico		
Longitud de onda empleada	228,8 nm	283,3 nm	193,7 nm
Volumen de inyección de muestra	20 µL		
Corrector de fondo	Corrector de fondo Zeeman		
Atomizador	Transversal		
Tubo de grafito	Plataforma de L'vov		
Modificador químico	Pd		
Cantidad de modificador	10 µg en 10 µL de volumen de inyección		

**Tabla N° 8. Parámetros de las curvas de calibración de cadmio, plomo y arsénico.**

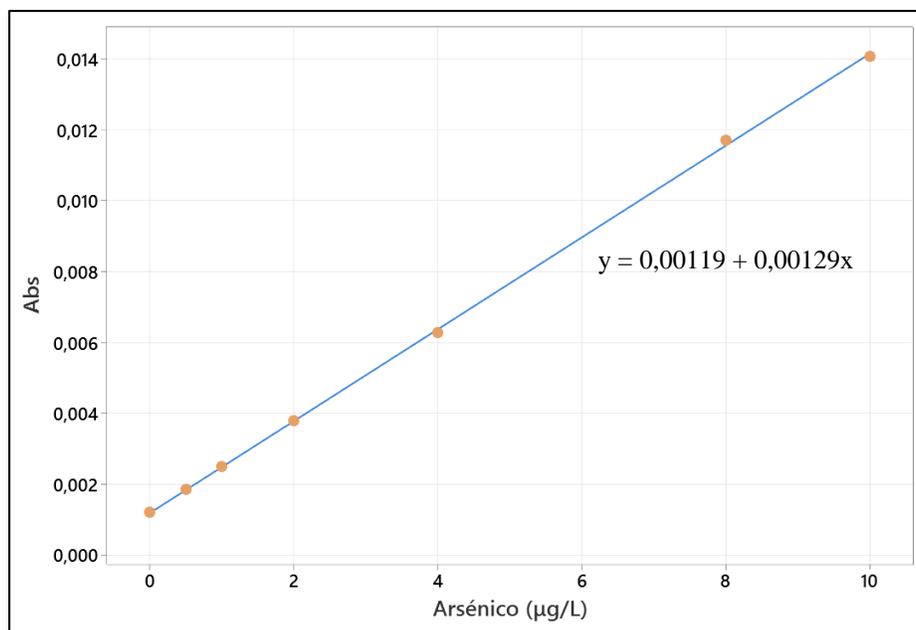
Metal	R <sup>2</sup>	Sensibilidad	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	% Recuperación
Cadmio	0,9998	0,0557	0,01	0,04	93,0
Plomo	0,9999	0,00247	0,007	0,02	95,2
Arsénico	0,9997	0,00129	0,04	0,07	96,5



**Figura N° 41. Curva de calibración para la determinación de cadmio en licor de cacao.**



**Figura N° 42. Curva de calibración para la determinación de plomo en licor de cacao.**



**Figura N° 43. Curva de calibración para la determinación de arsénico en licor de cacao.**

Siguiendo el Método Oficial de la AOAC 999.11 planteado en la Figura 25, fue posible determinar las concentraciones de cadmio (Figura 44), plomo (Figura 45) y arsénico (Figura 46) presentes en las muestras analizadas. Tal como se mencionó previamente, dos de las muestras fueron descartadas por no cumplir con los estándares físicos exigidos por la norma. De las 20 muestras restantes, se realizó una selección de aquellas que representan las regiones cacaoteras del país y que reflejan la variabilidad de los suelos venezolanos.

Al observar las Figuras 45 y 46, se tienen regulaciones de 0,5 mg/kg para las concentraciones de plomo y arsénico en cacao de acuerdo a la revisión de 2018 de la Norma COVENIN 50. Tal como indican las gráficas, las concentraciones de estos dos metales en las muestras analizadas se encuentran muy por debajo de los límites establecidos, hallándose dentro de la regulación de la norma.

Por otra parte, en la Figura 44, se observa que la regulación establecida por la Norma COVENIN 50 es de 0,3 mg/kg, donde solo tres de las muestras estarían cumpliendo con la concentración de cadmio permitida. Al ser Venezuela un país exportador de cacao, es importante considerar los límites establecidos por legislación europea, donde la cantidad

máxima de cadmio permitida en chocolates con más de un 50% de sólidos de cacao, es de 0,8 mg/kg (Commission Regulation (EU) No 488/2014. Artículo 2). Haciendo esta observación, ahora las muestras MC – 06, MC – 08, MC – 16 y MC – 22 también estarían dentro de los límites apropiados para su uso en la elaboración de chocolates en países en Europa. Quedando solo las muestras MC – 02 y MC – 07 provenientes del estado Mérida y la muestra MC – 17 del estado Apure con altas concentraciones de cadmio, que posiblemente deban ser evaluadas a largo plazo para lograr la mitigación de este metal.

De acuerdo a este análisis, se puede concluir que las concentraciones de cadmio en cacao son considerablemente mayores que para los otros metales estudiados. La razón de ello reside en la naturaleza de los metales contaminantes. Aunque todos se encuentran en el suelo y son absorbidos por la planta de cacao, solo el cadmio posee la movilidad suficiente para ser absorbido por las raíces del árbol cacaotero. En cambio, las principales fuentes de contaminación por arsénico y plomo se hallan en el procesamiento de los granos a partir de la de cosecha y postcosecha (Abt *et al.*, 2020).

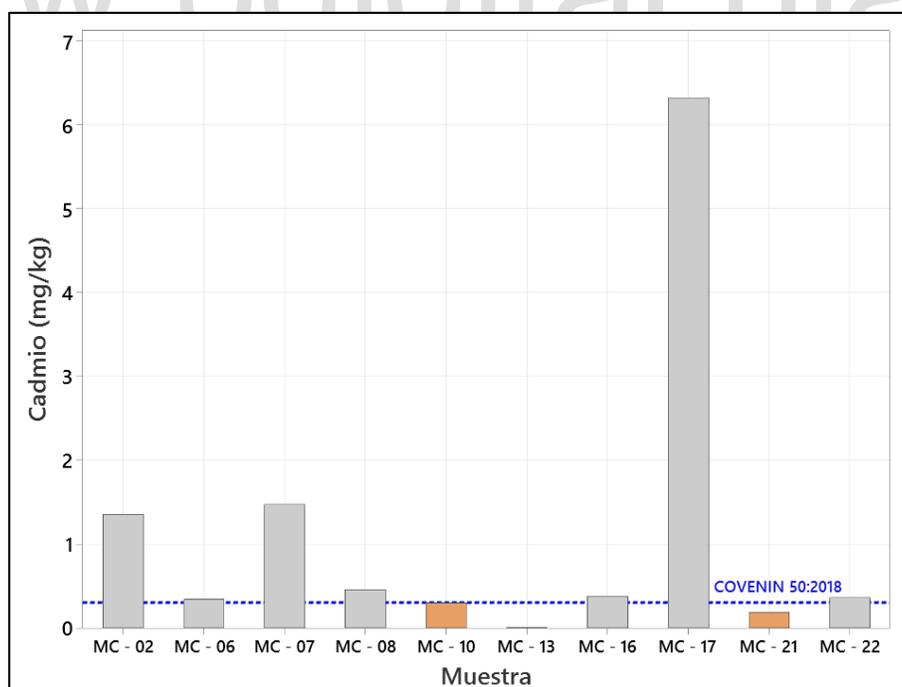
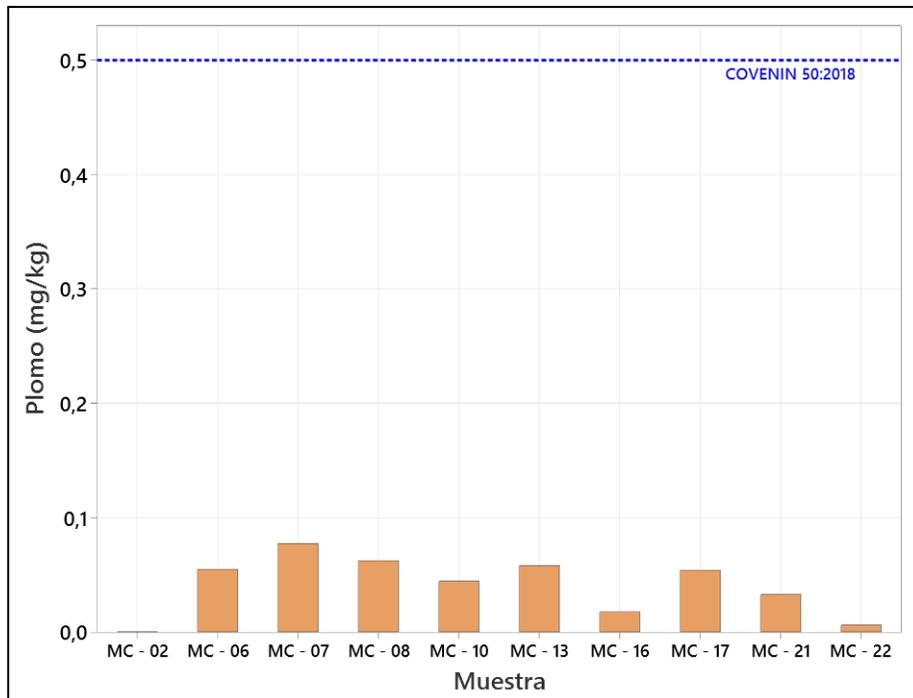
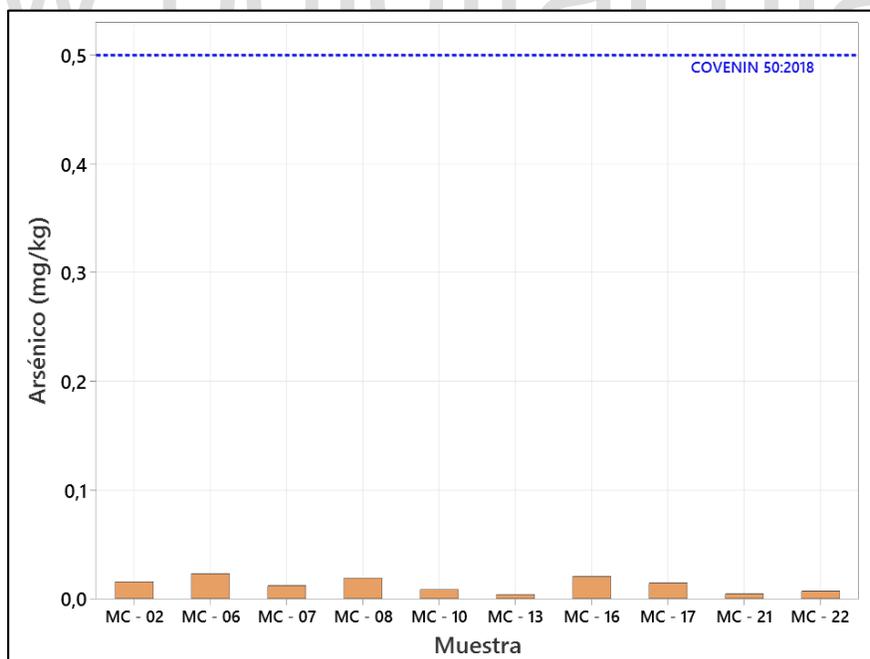


Figura N° 44. Concentración de cadmio (mg/kg) en las muestras.



**Figura N° 45. Concentración de plomo (mg/kg) en las muestras.**



**Figura N° 46. Concentración de arsénico (mg/kg) en las muestras.**

#### 6.4. Análisis de los contenidos de teobromina y cafeína vía HPLC

La determinación de los contenidos de teobromina y cafeína en muestras de cacao descascarillado, molido y desengrasado fue realizado mediante un cromatógrafo Waters Alliance 2690 (Milford, MA, USA), conectado a un módulo detector Waters 996 con arreglo de diodos. Las inyecciones de las muestras se realizaron con el automuestreador del módulo Alliance del equipo. Para ello, se emplearon los parámetros que se presentan a continuación en la Tabla 9. Las fases móviles usadas fueron filtradas a través de un filtro de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  y además fueron desgasificadas.

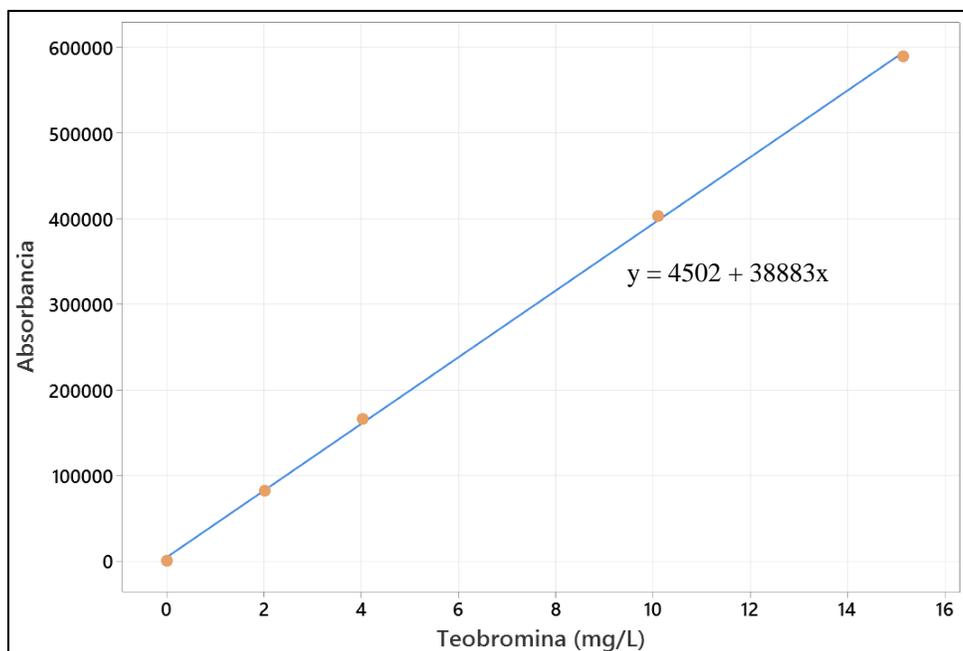
**Tabla N° 9. Parámetros empleados en el equipo cromatográfico Waters Alliance 2690, conectado a un módulo detector Waters 996 con arreglo de diodos.**

<b>Volumen de inyección de muestra</b>	20 $\mu\text{L}$
<b>Columna analítica</b>	NOVAPACK C18, 150 x 3,9mm, tamaño de partícula: 4 $\mu\text{m}$
<b>Fase móvil</b>	20%(v/v) metanol en agua
<b>Condiciones de elución</b>	Isocráticas
<b>Flujo (mL/min)</b>	1,2
<b>Temperatura</b>	Temperatura ambiente (25 °C)
<b>Detección</b>	UV – DAD, 274 nm

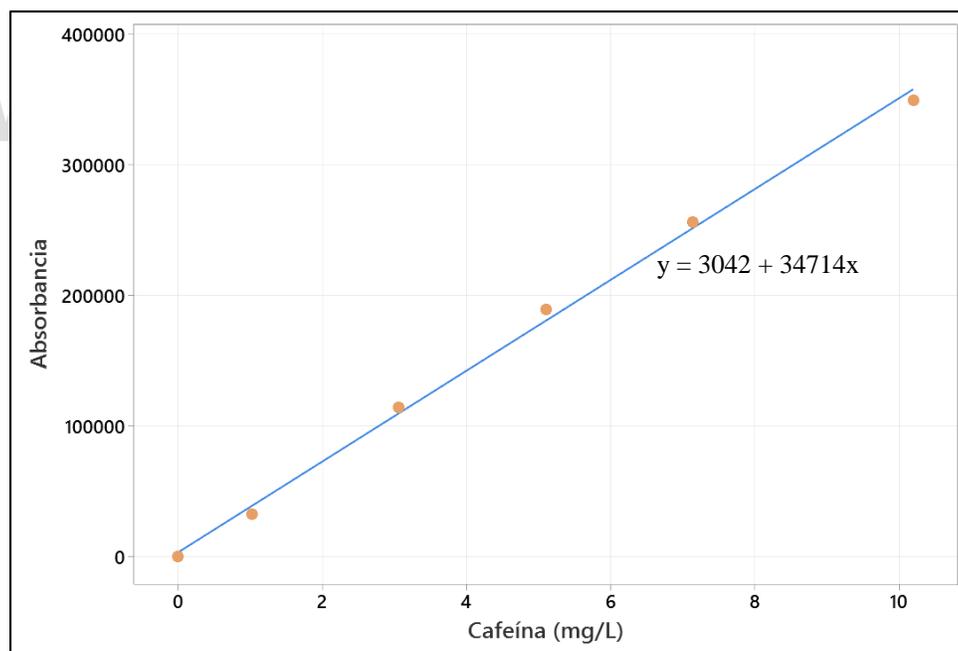
Para llevar a cabo esta determinación, se emplearon las curvas de calibración para teobromina y cafeína que se presentan a continuación con sus respectivos parámetros (Tabla 10, Figuras 47 – 48).

**Tabla N° 10. Parámetros de las curvas de calibración de teobromina y cafeína.**

<b>Analito</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Sensibilidad</b>	<b>LOD (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	<b>LOQ (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
Teobromina	0,9996	38883	0,10	0,50
Cafeína	0,9973	34714	0,10	0,50



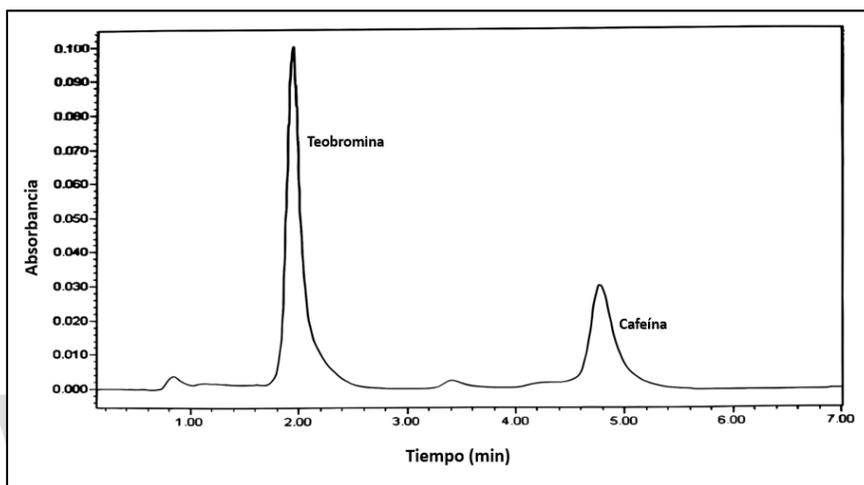
**Figura N° 47. Curva de calibración para la determinación de teobromina en cacao.**



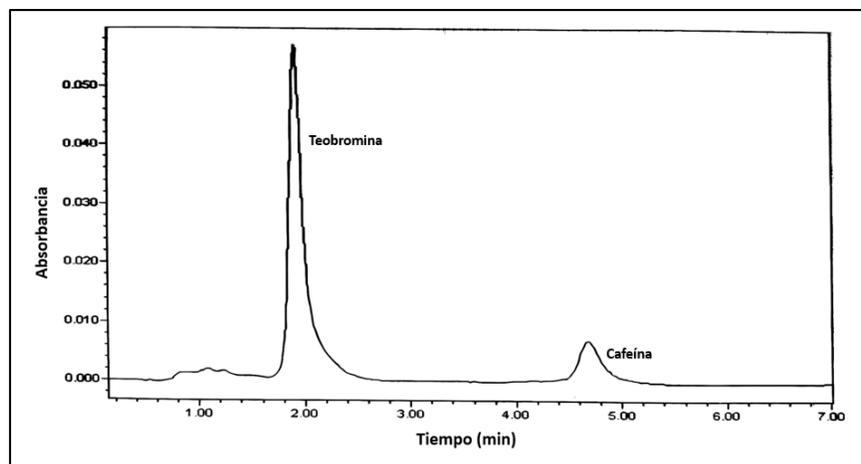
**Figura N° 48. Curva de calibración para la determinación de cafeína en cacao.**

Los cromatogramas y resultados obtenidos fueron analizados e interpretados empleado el Software MILLENIUM versión 3.2 de Waters (Milford, MA, USA). A continuación, se presentan tres cromatogramas que representan el análisis de teobromina y cafeína para

muestras referenciales de cacao Criollo, Trinitario y Forastero (Figuras 49 – 51). En estas Figuras se puede observar cómo la proporción de teobromina y cafeína cambia dependiendo de la variedad estudiada, siendo la diferencia entre cafeína y teobromina en el cacao Forastero la más alta. Por el contrario, en la variedad Criolla de cacao, esta diferencia es considerablemente menor, encontrándose finalmente, el cacao Trinitario en un punto intermedio. Esto es consistente con la genética del cacao Trinitario, siendo una variedad resultante del cruce entre el cacao Criollo y Forastero.



**Figura N° 49. Cromatograma de un cacao Criollo.**



**Figura N° 50. Cromatograma de un cacao Trinitario.**

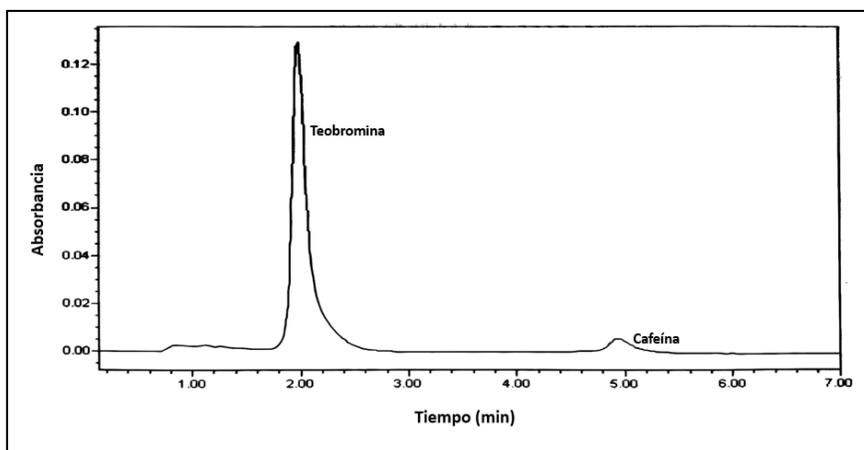


Figura N° 51. Cromatograma de un cacao Forastero.

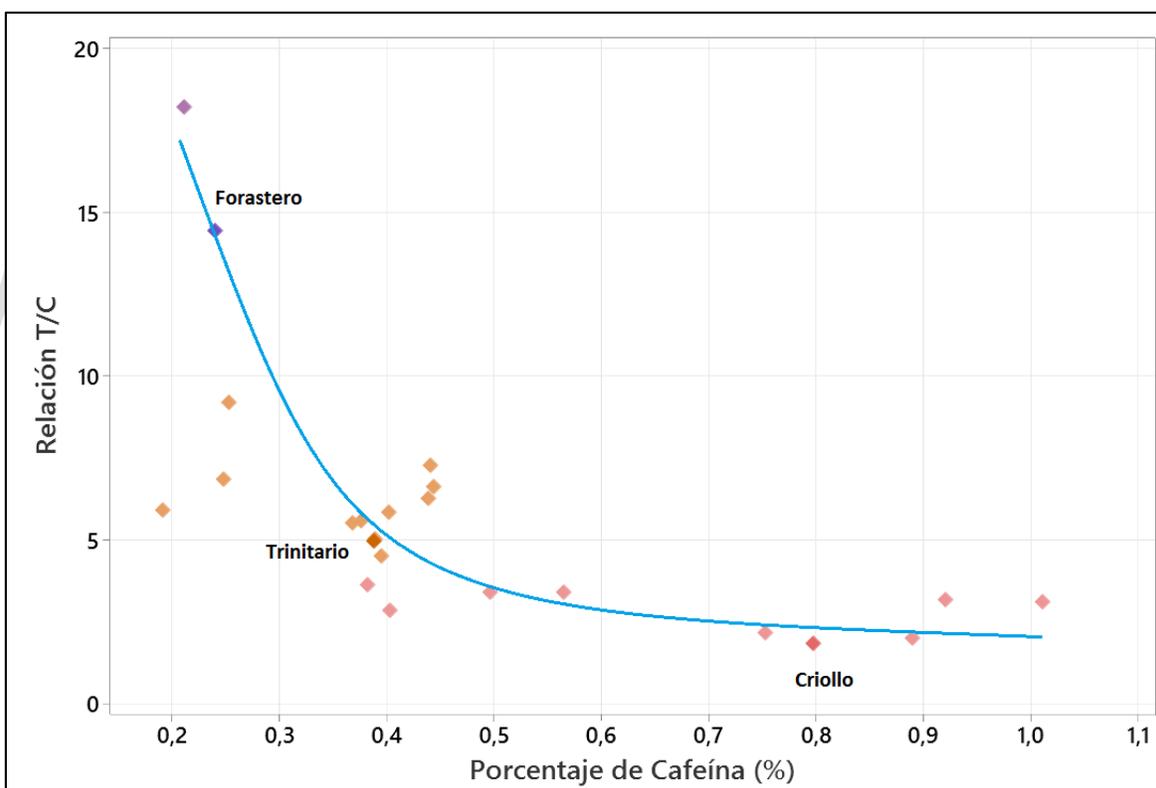


Figura N° 52. Gráfica de la relación T/C en función del porcentaje de cafeína.

Este comportamiento como resultado de la variedad genética, puede expresarse en un gráfico de la relación teobromina/cafeína (T/C) en función del porcentaje de cafeína (Figura 52). Los cacaos Forasteros se acumulan en la parte superior de la gráfica como resultado de su bajo contenido de cafeína, generando un T/C mayor a 10 en los mismos. Por otra parte, los cacaos

Criollos, se encuentran en la región inferior de la gráfica cubriendo un porcentaje de cafeína que va desde 0,4 hasta 1%, haciendo así que la relación T/C disminuya considerablemente. Nuevamente, se puede observar cómo los cacaos Trinitarios se aglomeran en la región central de la gráfica en su carácter de híbridos, con un T/C que va desde 5 hasta 10. Estos resultados son coherentes con los estudios hechos por Brunetto (2007) y Davrieux (2007).

### 6.5. Análisis del índice de fermentación

Esta determinación se realizó por medio de la espectrofotometría de absorción molecular en la región UV – visible. Para ello, se empleó un equipo con las siguientes especificaciones (Tabla 11).

Los resultados obtenidos, se presentan a continuación en la Figura 53. Como puede observarse, solo las muestras MC – 10, MC – 15 y MC – 16 se encuentran dentro del rango de 1 a 1,2 donde se indica una fermentación adecuada de acuerdo a esta metodología. Por otra parte, se compararon estos resultados con los porcentajes de fermentación y de granos criollos hallados mediante la prueba de corte, así como también, los genotipos de cacao encontrados en la determinación de teobromina y cafeína.

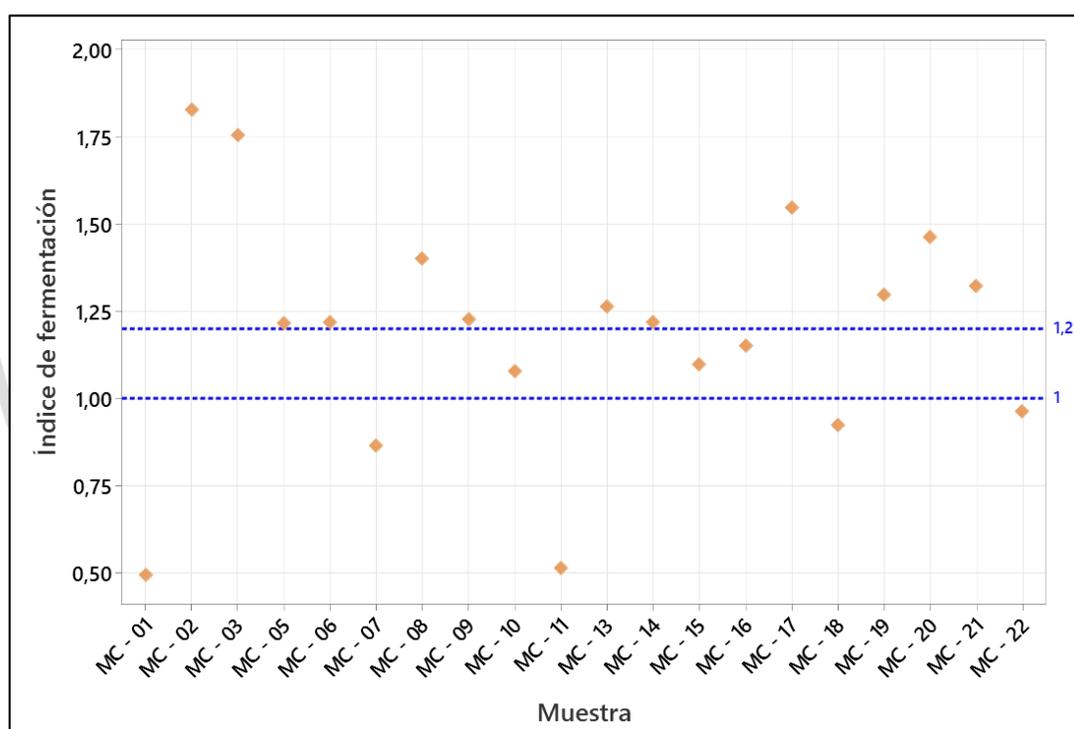
**Tabla N° 11. Especificaciones del equipo de absorción molecular en el UV – visible.**

Parámetro	Espectrofotómetro Shimadzu UV – visible UVmini – 1240V
Fuente	Lámpara de deuterio, lámpara halógena de tungsteno
Modo de medida	Altura de pico
Longitudes de onda	460 nm, 525 nm
Tipo de cubeta	Cuarzo
Volumen de muestra en cubeta	7 mL
Corrección de línea base	Automática por ordenador del equipo

De este análisis, no fue posible encontrar un patrón que relacione estos parámetros entre sí. Sin embargo, es conocido que esta metodología tiene una limitación en su aplicación a cacaos Criollos. El índice de fermentación depende de la medición de los productos pardos y de condensación de flavonoides los cuales se determinan a una longitud de 460nm, mientras que las antocianinas del cacao son medidas a 525 nm. Una relación de 1 entre estas

concentraciones es un indicador de la finalización de las reacciones de oxidación y condensación en el cacao. Por otra parte, en el cacao Criollo no se encuentran antocianinas.

En consecuencia, al estudiar muestras comerciales que suelen estar conformadas por diversas variedades de cacao, la efectividad de esta metodología se verá afectada significativamente. Por tanto, se sugiere para investigaciones posteriores, evaluar los índices de fermentación en muestras provenientes de una única variedad y su relación con porcentajes incrementales de cacaos Criollos.



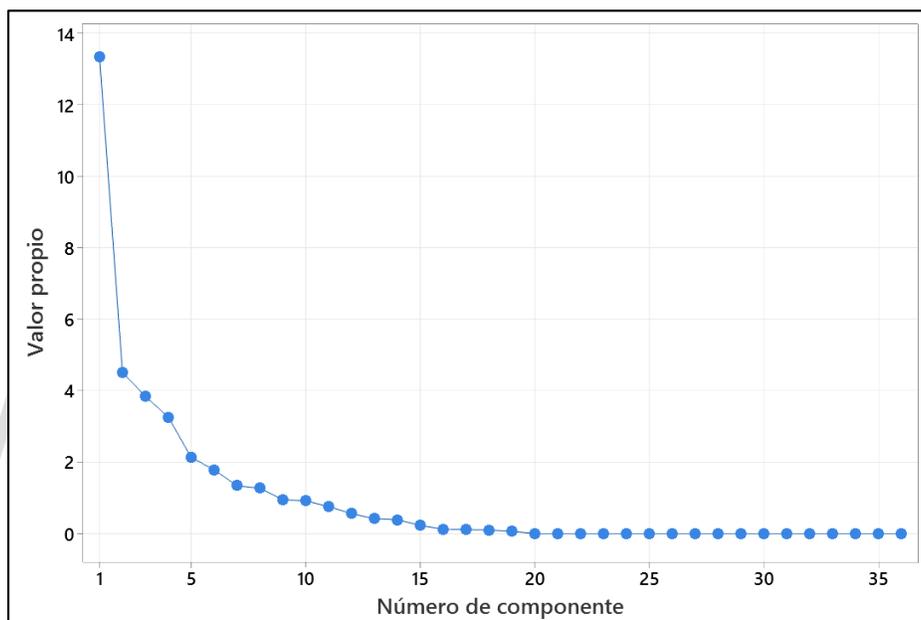
**Figura N° 53. Índices de fermentación de las muestras.**

### **6.6. Análisis de las características sensoriales de las muestras.**

El análisis sensorial realizado por el panel de cata del Laboratorio de Investigaciones en Análisis Químico, Industrial y Agropecuario (LIAQIA) compuesto por ocho miembros permitió generar un conjunto de datos que caracterizan sensorialmente a las muestras de cacao. Para evaluar esta matriz de datos, en primer lugar se aplicó el test de Grubbs, una prueba donde fueron descartados los valores atípicos que afectarían el procedimiento

estadístico posterior. Todo el procesamiento de datos se realizó empleando el software Minitab 21.

Luego de esto, se empleó un análisis de componentes principales para establecer las variables de mayor peso al momento de caracterizar las muestras. Para ello, se construyó una gráfica de sedimentación (Figura 54), donde se presenta al primer componente (PC1) como el de mayor peso al explicar la variabilidad de las muestras. Esto se refleja en el valor propio de 13,3 del mismo, en contraste con el valor de 4,5 de PC2.



**Figura N° 54. Gráfica de sedimentación.**

El gráfico de PC1 y PC2 (Figura 55) permitió identificar las variables con coeficientes de mayor magnitud en cada uno de los componentes. Al interpretar esta Figura, se puede identificar una asociación positiva de importancia entre los parámetros de calidad global, sabores a caramelo, parte interna de la nuez, y madera clara. Este grupo de variables son características de los cacaos Criollos, que a su vez son percibidos como de alta calidad. Por el contrario, en el extremo negativo de PC1, se encuentra una asociación de sabores a cacao, amargor, ácido acético, astringencia y madera oscura, así como el grado de tostado del cacao, estos descriptores se encuentran presentes en los cacaos Forasteros. Adicionalmente, se observa una posible asociación entre sabores a fruta amarilla, fruta marrón, piel de la nuez, fruta oscura, fruta tropical y flores, consistente con los atributos presentes en los cacaos

Trinitarios del país. En consecuencia, se concluye que PC1 describe principalmente la variabilidad genética de las muestras de cacao.

Al verificar estos resultados con los obtenidos en la cuantificación de teobromina y cafeína de las muestras analizadas, se encontró consistencia con el análisis hecho por medio de esta metodología. Encontrando sabores básicos en la muestra MC – 01 calificada como un cacao Forastero, resaltando atributos como sabor a cacao, amargor, acidez y un alto grado de tostado, además de una nota a madera oscura. Mientras que en los cacaos clasificados como Criollos de acuerdo a la técnica cromatográfica, si fueron percibidos sabores a nueces, azúcar caramelizado o panela, madera clara, además de haber sido caracterizados con una alta puntuación global. Finalmente, en los cacaos Trinitarios evaluados fue posible encontrar los sabores frutales que los describen y en la muestra MC – 20 fue notorio el sabor floral. Tal como lo indica Davrieux (2007), parece necesario continuar complementando ambas metodologías para el análisis sensorial e identificación de genotipos en el cacao, ya que esto permitiría encontrar el perfil sensorial de las muestras provenientes de diversas regiones del país.

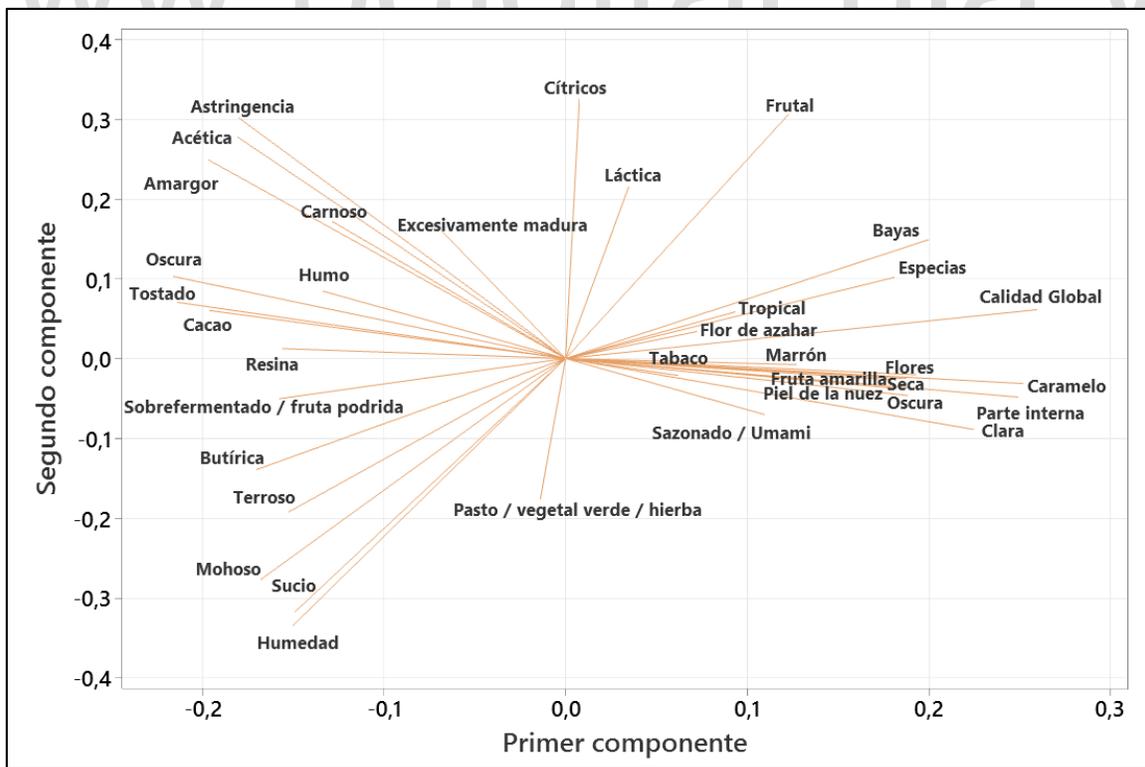


Figura N° 55. Gráfica de influencias.

## 7. CONCLUSIONES

- ❖ Al hacer el análisis de los parámetros físicos de acuerdo a las regulaciones establecidas por la Norma COVENIN 50:1995 fue posible clasificar las muestras analizadas en función de su calidad. Como resultado, se obtuvo solo una muestra de Cacao Fino de Primera (F<sub>1</sub>), mientras que el resto de las muestras clasificó como Cacao Fino de Segunda (F<sub>2</sub>). Siendo el porcentaje de fermentación, el parámetro que determinó la clasificación de las muestras analizadas.
- ❖ Al considerar los límites de regulación de la Norma COVENIN 50:2018 para porcentaje de fermentación, se obtuvo una clasificación de una muestra de Cacao Extrafino, tres muestras de Cacao Fino de Primera y dieciocho muestras de Cacao Fino de Segunda, a pesar de la flexibilización en los porcentajes de esta norma. Esto indica la necesidad de un mayor control en los procesos postcosecha por parte de los productores.
- ❖ Se verificaron los parámetros de seguridad alimentaria por medio del estudio del contenido de cadmio, plomo y arsénico en diez muestras que representan las regiones cacaoteras del país. Encontrando que todas las muestras cumplen en cuanto a las regulaciones de plomo y arsénico de acuerdo a la Norma COVENIN 50:2018 (1era Revisión). Sin embargo, al estudiar los contenidos de cadmio, siete de las muestras exceden la regulación de 0,3 mg/kg establecida en dicha norma, mientras que tres de las muestras exceden la regulación de 0,8 mg/kg establecida por la legislación europea de 2019.
- ❖ La determinación de las concentraciones de teobromina y cafeína vía HPLC permitió determinar el genotipo de los cacaos analizados. En este sentido, la muestra MC – 01 es un cacao Forastero (Mérida). Se obtuvieron 11 muestras de cacao Trinitario: MC – 03, MC – 07 y MC – 09 (Mérida); MC – 05, MC – 06, MC – 11, MC – 20 y MC – 21, provenientes de la región central (Carabobo, Miranda y Aragua); MC – 10, MC – 16 y MC – 22 de la región oriental del país (Sucre y Bolívar). En cuanto a los cacaos Criollos, se tienen las siguientes muestras: MC – 02 de Mucujepe (Mérida), MC – 17 y MC – 19 (Apure), representando a la región occidental. Mientras que en la región central se encontraron: MC – 08 y MC – 18 (Carabobo); MC – 13, MC – 14 y MC – 15 (Aragua).

- ❖ El estudio del índice de fermentación indica que se presentaron limitaciones en esta determinación, debido al análisis de muestras comerciales compuestas por una mezcla de variedades. Por tanto, para investigaciones posteriores, se sugiere evaluar los índices de fermentación de muestras provenientes de un único genotipo, y su variación con porcentajes incrementales de cacaos Criollos.
- ❖ Al hacer uso de las herramientas que proporciona el análisis sensorial y aplicar un análisis de componentes principales, fue posible detectar los parámetros de mayor peso al momento de clasificar las muestras de cacao: siendo descriptores como azúcar caramelizada, nuez, madera clara y una alta puntuación en calidad global, parámetros de gran importancia al momento de caracterizar los cacaos Criollos analizados. Sabores a cacao, amargor, acidez, astringencia y madera oscura, descriptores imprescindibles para describir a los cacaos Forasteros. Por otra parte, características como los sabores a frutas amarillas, fruta marrón, fruta oscura, fruta tropical, nuez con piel y flores, primordiales para describir los cacaos Trinitarios analizados. Esto permitió concluir que el primer componente principal es el descriptor fundamental de la variabilidad genética en las muestras de acuerdo a los atributos presentes en cada genotipo.
- ❖ Los resultados del análisis sensorial fueron consistentes con la determinación cromatográfica para teobromina y cafeína, encontrando los atributos que se describieron previamente en las muestras clasificadas como Criollos, Trinitarios y Forasteros mediante la relación T/C de cada una de las muestras.
- ❖ De acuerdo a la Norma COVENIN 50:2018 (1era. Revisión), la muestra MC – 08 de la Hacienda El Recreo Edo. Carabobo es un cacao Extrafino ya que posee un porcentaje de fermentación de 80%. Mientras que las muestras MC – 06, MC – 13 y MC – 18 provenientes de la Hacienda San Cayetano, Edo. Carabobo, FundoCacao C.A., Cumboto Edo. Aragua y Hacienda El Recreo Edo. Carabobo, respectivamente, son cacaos Finos de Primera por tener porcentajes superiores a 74% de fermentación. Por otra parte, se consiguió un lote de muestras clasificadas como Cacao Finos de Segunda con fermentación mayor al 70%, entre ellas: MC – 02 (Finca Pan y Amor, Edo. Mérida), MC – 14 (FundoCacao C.A., Cumboto Edo. Aragua) y MC – 16 (Hacienda San José, Edo. Sucre). Mientras que la muestra con el porcentaje más bajo de fermentación, fue la muestra MC – 01 de Nueva Bolivia Edo. Mérida.

- ❖ Como resultado del análisis de los parámetros físicos, químicos y sensoriales en muestras de cacao venezolano, existe un manejo adecuado en cuanto a los parámetros físicos de las muestras. No obstante, el proceso de fermentación requiere más control para lograr mayores porcentajes y por tanto una mejor clasificación en cuanto a la calidad del cacao. Por otra parte, en el análisis de metales pesados, las muestras provenientes del estado Apure requieren un seguimiento a largo plazo para lograr la mitigación del cadmio. En cuanto a la calidad sensorial encontrada en las muestras, es importante acotar que el manejo postcosecha influyó significativamente, ya que la puntuación global fue afectada por los defectos percibidos en las muestras posiblemente debido a sobrefermentación o cacaos insuficientemente fermentados.

www.bdigital.ula.ve

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abt, E., Robin, LP. (2020). Perspective on cadmium and lead in cocoa and chocolate. *J. Agric. Food Chem.* 18;68 (46): 13008 – 13015. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b08295.

Afoakwa, E. O. (2014). *Cocoa production and processing technology*. CRC Press.

Álvarez, C., Liconte, N., Pereira, Y. C., Farías, A. G., Buscema, I., y Láres, M. (2018). Perfil de calidad comercial del cacao Venezolano (*Theobroma cacao* L.). *Novum Scientarum*, 3(7), 21- 32.

Association of Official Analytical Chemists (1999). AOAC Official Method 999.11. Determination of Lead, Cadmium, Copper, Iron and Zinc in Foods. Atomic Absorption Spectrophotometry after Dry Ashing.

Bispo, M., Veloso, M., Pinheiro, H., De Oliveira, R., Reis, J., & De Andrade, J. (2002) Simultaneous determination of caffeine, theobromine and theophylline by high – performance liquid chromatography. *Journal of chromatographic science*, 40(1), 45 – 48.

Brunetto, M., Gutiérrez, L., Delgado, Y., Gallignani, M., Zambrano, A., Gómez, Á., Ramos, G., & Romero, C. (2007). Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high – performance liquid chromatographic method with on – line sample cleanup in a switching – column system. *Food chemistry*, 100(2), 459 – 467.

CAOBISCO/ECA/FCC (2015). *Cocoa beans: Chocolate and cocoa industry quality requirements*. (End, M. J. and Dand, R., Editors).

Cocoa of Excellence Programme. (2021). *Glossary of terms for cocoa bean flavour evaluation as liquor*.

Comisión Venezolana de Normas Industriales (1995). Norma COVENIN 50:1995. Granos de cacao (2<sup>da</sup> Revisión).

Comisión Venezolana de Normas Industriales (1995). Norma COVENIN 374:1995. Granos de cacao. Determinación de humedad (1<sup>era</sup> Revisión).

Comisión Venezolana de Normas Industriales (1995). Norma COVENIN 442:1995. Granos de cacao. Prueba del corte (1<sup>era</sup> Revisión).

Comisión Venezolana de Normas Industriales (1995). Norma COVENIN 1340:1995. Cacao y derivados. Determinación de grasa cruda (1<sup>era</sup> Revisión.)

Commission Regulation (EU) No. 488/2014. Artículo 2. 12 de mayo del 2014. Unión Europea.

Cruz Montesinos, E. (2012). Caracterización de la cadena agroproductiva de cacao en El Salvador. El Salvador.

Cuatrecasas, J. (1964). Cacao and its allies: A taxonomic revision of the genus Theobroma. (Vol. 35, No. 6). Smithsonian Institution Press.

Davrieux, F., Assemat, S., Boulanger, R., & Cros, E. (2003). Determination of cocoa purine content by near infrared spectroscopy. CIRAD.

Davrieux, F., Assemat, S., Sukha, D. A., Bastianelli, D., Boulanger, R., & Cros, E. (2007) Genotype characterization of cocoa into genetic groups through caffeine and theobromine content predicted by near infrared spectroscopy. IM Publications.

Díez, P. V. (2014). Efecto de la hidrólisis ácida en la medición de grasa cruda en leche y cocoa en polvo, chocolate instantáneo y alimento para camarón. (Doctoral dissertation, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano).

Espín, S., & Samaniego, I. (2016). Manual para el análisis de parámetros químicos asociados a la calidad del cacao. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Quito, Ecuador.

Estrada, W., Romero, X., & Moreno, J. (2011). Promoviendo la biodiversidad y autosostenibilidad con Ojushte, Cacao y Permacultura en cooperativas y comités de mujeres de CONFRAS. Guía técnica del cultivo de cacao manejado con técnicas agroecológicas. San Salvador (El Salvador).

European Food Safety Authority (2009). Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on cadmium in food. EFSA Journal, 980, 1-139.

European Food Safety Authority (2010 rev 2013). Scientific opinion on lead in food. EFSA Journal, 8(4). 1570. DOI: 10.2903/j.efsa.2010.1570

Girón, C., Tortolero, J., & Sánchez, J. (2007). Theobroma cacao L. (Sterculiaceae) en la región nororiental de la Isla Margarita, estado Nueva Esparta, Venezuela. Plant Genetic Resources Newsletter FAO/IPGRI, 138.

Guzmán, J., & Gómez, S. (2014). Evaluación sensorial del cacao (*Theobroma cacao* L.) cultivado en la región del sur del departamento de Bolívar (Colombia). *RIAA*, 5(2), 221 – 236.

Hashimoto, J. C., Lima, J. C., Celeghini, R. M., Nogueira, A. B., Efraim, P., Poppi, R. J., & Pallone, J. A. (2018). Quality control of commercial cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) by near – infrared spectroscopy. *Food analytical methods*, 11, 1510 – 1517.

Henderson, J. S., Joyce, R. A., Hall, G. R., Hurst, W. J., & McGovern, P. E. (2007). Chemical and archaeological evidence for the earliest cacao beverages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(48), 18937 – 18940.

International Cocoa Organization (2022). *Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics*, Vol. XLVIII, No. 4, Cocoa year 2021/2022.

Intriago, F. G., Talledo, M. V., Cuenca, G., Macías, J., Álvarez, J., & Menjívar, J. (2019). Evaluación del contenido de metales pesados en almendras de cacao (*Theobroma cacao* L.) durante el proceso de beneficiado. *Pro Sciences: Revista de Producción, Ciencias e Investigación*, 3(26), 17 – 23.

Krähmer, A., Engel, A., Kadow, D., Ali, N., Umaharan, P., Kroh, L. W., & Schulz, H. (2015). Fast and neat – Determination of biochemical quality parameters in cocoa using near infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 181, 152 – 159.

Leal, F., Sánchez, P., & Valderrama, E. (1997). El género *Theobroma* en el estado silvestre en Venezuela. *Congreso Venezolano del Cacao y su Industria*. Caracas (Venezuela), Nov 1997. Consejo Nacional para la Investigación, la Ciencia y la Tecnología.

Machado, L., Sánchez, J., Chila, A. F., Murcia, V., Saavedra, D., Cano, O., Guzmán, K., & Ordoñez, C. (2018). *Prácticas y procesos que inciden en el aseguramiento de la calidad del cacao Theobroma cacao L.* Centro de formación Agroindustrial La Angostura. Campoalegre, Huila (Colombia).

Pérez, E., Guzmán, R., Álvarez, C., Lares, M., Martínez, K., Suniaga, G., & Pavani, A. (2021) Cacao, cultura y patrimonio: un hábitat de aroma fino en Venezuela. *RIVAR* (Santiago), 8(22), 146 – 162.

Pontillon, J. (1997). *Cacao et chocolat: Production, utilisation, caractéristiques*. Lavosier. DOI: 2-7430-0174-7

- Quattrocchi, O., Abelaira de Andrizzi, S., & Laba, R. (1992). *Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica*. Buenos Aires, Argentina. (P. 3 – 40).
- Quintana, L. F., & García, A. (2021) *Evaluación integral de la calidad sensorial del cacao*. Libros Universidad Nacional Abierta y a Distancia, 1 – 139.
- Ramírez, L. A. (2015). El cultivo de cacao Venezolano a partir de Maruma. *Historia Caribe*, 10(27), 69 – 101.
- Ramos, G., Gómez, A., & Zambrano, A. (2014). *Análisis de calidad en almendras de cacao. Manuel de laboratorio*. Primera edición. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.
- Romero, D., Yáñez, G. S., Simbaña, K., Navarrete, H. (2019). Content and the relationship between cadmium, nickel and lead concentrations in Ecuadorian cocoa beans from nine provinces. *Food control*, 106, 106750.
- Shin, J. M., Hwang, Y. O., Tu, O. J., Jo, H. B., Kim, J. H., Chae, Y. Z., Park, S. K., (2013). Comparison of different methods to quantify fat classes in bakery products. *Food Chemistry*, 136 (2), 703 – 709. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.08.033.
- Skoog, D., Holler, F., & Crouch, S. (2008). *Principios de análisis instrumental*. Sexta Edición. Cengage Learning Editores. México, D. F. (P. 131 – 361, 816 – 850).
- Skoog, D., West, D., Holler, F., & Crouch, S. (2015). *Fundamentos de química analítica*. Novena edición. Cengage Learning Editores. México, D. F. (P. 649 – 786, 912 – 932).
- Tan, J., Balasubramanian, B., Sukha, D., Ramkissoon, S., & Umaharan, P. (2019). Sensing fermentation degree of cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans by machine learning classification models based electronic nose system. *Journal of Food Process Engineering*, 42(6), 13175.
- Teye, E., Anyidoho, E., Agbemafle, R., Sam – Amoah, L. K., & Elliott, C. (2019). Cocoa bean and cocoa bean products quality evaluation by NIR spectroscopy and chemometrics: A review. *Infrared Physics and Technology*, 104, 103127.
- Valdez, F. (2019) Evidencias arqueológicas del uso social del cacao en la Alta Amazonía. *Revista de Historia, Patrimonio, Arqueología y Antropología Americana*, (1), 117 – 134.
- Vera, J., Vallejo, C., Párraga, D., Morales, W., Macías, J., & Ramos, R. (2014). Atributos físicos – químicos y sensoriales de las almendras de quincen clones de cacao nacional (*Theobroma cacao* L.) en el Ecuador. *Ciencia y Tecnología*, 7(2), 21 – 34.
- Yapo, K. D., Ouffoue, S. K., N’guessan, B. R., Okpekon, T. A., Dade, J., Say, M., & Kouakou, T.H. (2014). Quality control by the determination of heavy metals in new variety

of cocoa (cocoa mercedes) in Côte d'Ivoire. *Journal de la Société Ouest – Africaine de Chimie*, 37, 56.

Yro, A., N'zi, C. E., & Kpalma, K. (2018). Cocoa beans fermentation degree assessment for quality control using machine vision and multiclass svm classifier. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 24(4), 1711 – 1717.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## Apéndice 1

### Carta de Pruebas de Corte para Cacao

#### Almendras Bien Fermentadas



Criollo

Trinitario

Forastero

#### Almendras Parcialmente Fermentadas



Criollo

Trinitario

Forastero

#### Almendras Pizarrosas



Criollo

Trinitario

Forastero

#### Almendras Defectuosas



Mohosa

Hongos

Infestada

Elaborado por: Gladys Ramos C., Alvaro Gómez M., Alexis Zambrano G.

Escala 1 : 0,7



