



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ
MANUEL FÉLIX LÓPEZ**

DIRECCIÓN DE POSGRADO Y FORMACIÓN CONTINUA

**INFORME DE INVESTIGACIÓN PREVIO A LA
OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
MAGISTER EN AGROINDUSTRIA**

MODALIDAD:

TRABAJO DE TITULACIÓN

TEMA:

**REMOCIÓN DE CADMIO EN ALMENDRAS DE CACAO EN
PROCESO POSCOSECHA CON AGENTES QUELANTES,
MEDIOS ÁCIDOS, LAVADO Y PRESECADO**

AUTOR:

ING. WILSON PAÚL CEDEÑO GUZMAN

TUTOR:

ING. LUIS ALBERTO DUICELA G. Mg.Sc.

COTUTOR:

ING. ALEJANDRO ALTAMIRANO BRIONES

CALCETA, AGOSTO 2020

DERECHOS DE AUTORÍA

WILSON PAÚL CEDEÑO GUZMÁN, declaro bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional, que se han respetado los derechos de autor de terceros, por lo que asumo la responsabilidad sobre el contenido del mismo, así como ante la reclamación de terceros, conforme a los artículos 4, 5 y 6 de la Ley de Propiedad Intelectual.

A través de la presente declaración cedemos los derechos de propiedad intelectual a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, según lo establecido en el artículo 46 de la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.



ING. WILSON PAÚL CEDEÑO GUZMÁN

CERTIFICACIÓN DE TUTOR

ING. LUIS ALBERTO DUICELA GUAMBI, M. Sc, certifica el trabajo de titulación REMOCIÓN DE CADMIO EN ALMENDRAS DE CACAO EN PROCESO POSCOSECHA CON AGENTES QUELANTES, MEDIOS ÁCIDOS, LAVADO Y PRESECADO que ha sido desarrollada por WILSON PAÚL CEDEÑO GUZMÁN, previo a la obtención del título de Magister en AGROINDUSTRIA, de acuerdo al REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN DE LA UNIDAD DE TITULACIÓN ESPECIAL de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Luis Duicela Guambi', is written over a horizontal line.

ING. LUIS DUICELA GUAMBI, M. Sc.

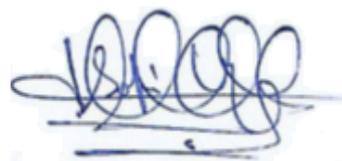
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los suscritos integrantes del tribunal correspondiente, declaramos que hemos **APROBADO** el trabajo de titulación **REMOCIÓN DE CADMIO EN ALMENDRAS DE CACAO EN PROCESO POSCOSECHA CON AGENTES QUELANTES, MEDIOS ÁCIDOS, LAVADO Y PRESECADO**, que ha sido propuesto, desarrollado por **WILSON PAÚL CEDEÑO GUZMÁN**, previa la obtención del título de **MAGISTER EN AGROINDUSTRIA** de acuerdo el **REGLAMENTO DE LA UNIDAD DE TITULACIÓN** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.



PhD. Julio Saltos Solórzano

MIEMBRO



Mg. Sofía Velásquez Cedeño

MIEMBRO



PhD. Ely Fernando Sacón Vera

PRESIDENTE

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López que me dio la oportunidad de crecer como ser humano a través de una educación superior de calidad y en la cual he forjado mis conocimientos profesionales día a día;

A todos los profesionales que han formado parte de este proceso de educación de cuarto nivel, docentes, compañeros de maestría, tutor Ing. Luis Duicela Guambi, cotutor Ing. Alejandro Altamirano Briones y todos los que forman parte del departamento de Posgrado;

A la Corporación Alemana para el Desarrollo GIZ por ser parte importante del proyecto de tesis aportando contribuciones que permitieron el desarrollo de este trabajo en especial al Ing. Pedro Ramírez;

Al Instituto de Investigaciones Agropecuaria INIAP, por su valioso aporte en el desarrollo del trabajo de tesis en especial al Dr. Manuel Carrillo;

Supremamente quiero agradecer a Dios por darme la oportunidad de vivir cada momento de mi vida y a toda mi familia siempre estuvieron apoyándome y alentándome para seguir adelante.

Paúl Cedeño Guzmán

DEDICATORIA

La vida está conformada por etapas, cada etapa por momentos, estos momentos son los que hacen la diferencia en cada ser humano; quiero dedicar este logro primeramente a mis padres José Cedeño (+) y Graciela Guzmán (+) por enseñarme a luchar y transferirme muchos valores, a mis hermanos y hermana que siempre están pendientes de cada logro en mi vida, a mis suegros por ser la fortaleza que necesita un hijo para seguir adelante, a mis sobrinos y sobrinas para que encuentren una motivación en sus vidas y puedan alcanzar sus sueños, a mis cuñados y cuñadas, ellos siempre están ahí.

Finalmente quiero dedicar este logro con mucho amor a mi hijo Jean Paúl y mi hija Sahily, son la fuente de energía de mi existir todo lo que se propongan lo podrán conseguir, a mi querida esposa Lorena, mí cómplice y compañera, este logro también es tuyo.

Paúl Cedeño Guzmán

CONTENIDO GENERAL

DERECHOS DE AUTORÍA	ii
CERTIFICACIÓN DE TUTOR	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL.....	iv
CONTENIDO GENERAL.....	vii
CONTENIDO DE TABLAS Y FIGURAS.....	x
AGRADECIMIENTO.....	v
DEDICATORIA.....	vi
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	1
1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	1
1.2. JUSTIFICACIÓN	2
1.3. OBJETIVOS	3
1.3.1 OBJETIVO GENERAL.....	3
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
1.4. HIPÓTESIS	3
CAPITULO II. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. CULTIVO DE CACAO	4
2.1.1. VARIEDADES DE CACAO.....	5
2.1.2. COSECHA Y POS COSECHA	5
2.1.3. TIPOS DE FERMENTADORES	6
2.1.4. PRESECADO.....	8
2.1.5. SECADO	8
2.1.6. CALIDAD FÍSICA Y SENSORIAL EN ALMENDRAS DE CACAO.....	9
2.2. METALES PESADOS	10
2.2.1. METALES PESADOS EN SUELOS	10
2.2.2. CADMIO.....	11
2.2.3. CADMIO EN PLANTAS DE CACAO	12
2.2.4. CADMIO EN ALMENDRAS DE CACAO	12
2.3. MECANISMOS DE ACCIÓN DE QUELANTES EN LA MOVILIZACIÓN Y REMEDIACIÓN DE CADMIO.....	13
2.3.1. QUELANTES.....	13
2.3.2. QUELANTES INTRACELULARES.....	13

2.3.3. METALOTIONEÍNAS	13
2.3.4. FITOQUELATINAS.....	14
2.3.5. RESPUESTA DE QUELANTES Y MEDIOS ÁCIDOS EN METALES PESADOS.....	14
CAPITULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO	17
3.1. UBICACIÓN	17
3.1.1. CARACTERÍSTICAS AGROECOLÓGICAS ^{1/}	17
3.1.2. DATOS EDÁFICOS ^{2/}	17
3.2. DURACIÓN	17
3.3. MÉTODOS DE REMOCIÓN DE CADMIO	18
3.4. DISEÑO DE LOS TRATAMIENTOS	18
3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL	18
3.6. UNIDAD EXPERIMENTAL	18
3.7. VARIABLES	19
3.7.1. VARIABLES INDEPENDIENTES	19
3.7.2. VARIABLES DEPENDIENTES.....	19
3.7.3. CONTENIDO DE CADMIO.....	19
3.7.4. CARACTERÍSTICAS DE CALIDAD FÍSICAS Y SENSORIALES	19
3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	20
3.9. MANEJO DEL EXPERIMENTO.....	20
3.9.1. COLECTA DE LAS MUESTRAS.....	21
3.9.2. SOLUCIONES DE MEDIOS ÁCIDOS	22
3.9.3. SOLUCIONES DE QUELANTES	22
3.9.4. PRESECADO Y LAVADO	23
3.9.5. FERMENTACIÓN DEL CACAO	23
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
4.1. REMOCIÓN DE CADMIO EN LA ETAPA DE RECEPCIÓN DEL PROCESO POSCOSECHA DEL CACAO	26
4.1.1 CONTENIDO DE CADMIO.....	26
4.2. ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE ALMENDRAS DE CACAO	27
4.3. ANÁLISIS SENSORIAL DE LICOR DE CACAO	29
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	33
5.1. CONCLUSIONES.....	33
5.2. RECOMEDACIONES.....	33

BIBLIOGRAFÍA	34
ANEXO 1	40
ANEXO 2	41
ANEXO 3	43
ANEXO 4	44

CONTENIDO DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

TABLA 1. DISEÑO DE LOS TRATAMIENTOS.....	18
TABLA 2. ESQUEMA DEL ANÁLISIS DE VARIANZA.	18
TABLA 3. ESCALA HEDÓNICA PARA LA EVALUACIÓN SENSORIAL DE LOS ALIMENTOS... ..	25
TABLA 4. CONTENIDO DE CADMIO EN ALMENDRAS DE CACAO.	26
TABLA 5. ANÁLISIS FÍSICO EN ALMENDRAS DE CACAO.	28
TABLA 6. ANÁLISIS SENSORIAL DE ALMENDRAS DE CACAO.	29
TABLA 7. MATRIZ DE CORRELACIONES ENTRE CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DEL GRANO Y ATRIBUTOS SENSORIALES EN CACAO.	32

FIGURAS

FIGURA 1. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	21
FIGURA 2. MUESTRAS DE CACAO COLECTADO DISTRIBUIDAS POR TRATAMIENTO.....	22
FIGURA 3. PROCESO DE FERMENTACIÓN DE LAS MUESTRAS DE CACAO.....	23
FIGURA 4. VARIABLES POSITIVAS DE PERFILES DE SABOR DE MUESTRAS DE CACAO. .	30
FIGURA 5. ANÁLISIS DE CONGLOMERADO DE MUESTRAS DE CACAO PARA REDUCIR CONTENIDO DE CADMIO.	31

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue determinar los métodos para reducir niveles de cadmio en almendras de cacao durante la poscosecha mediante métodos acidificantes y quelantes, así como, presecado y lavado. Los tratamientos evaluados fueron HCL a pH 3.0, HCL a pH 3.5, HCL a pH 4.0, EDTA, $C_6H_8O_7$, lavado, presecado y un testigo. En los tratamientos de soluciones ácidas y quelantes los granos fueron sumergidos 60 minutos, mientras que el tratamiento lavado se sumergió en agua destilada, se lavó, posteriormente continuó su proceso de fermentado y secado, el tratamiento presecado consistió, en sacar los granos en baba de la mazorca y seguido se expuso al sol por 60 minutos, luego se continuo el proceso poscosecha. El contenido de cadmio se determinó en el Laboratorio de suelos y agua del INIAP Pichilingue. El diseño utilizado fue completamente al azar de ocho tratamientos con tres repeticiones. Se realizó el análisis de varianza y la separación de medias con prueba de Tukey al 5%. Los resultados indicaron que el contenido de Cadmio en los granos estuvo influenciado significativamente ($p < 0.05$) por el lavado ($0.43 \text{ mg Cd kg}^{-1}$) y presecado ($0.60 \text{ mg Cd kg}^{-1}$), esto equivale a una reducción del 49.2 y 28.6%, respectivamente con relación al testigo, además que no tuvo ningún efecto sobre la calidad física y sensorial del licor de cacao. La acidificación y uso de quelantes no tuvo efectos significativos en la reducción del contenido de cadmio.

Palabras clave: cadmio, poscosecha, medio ácido, contaminación del grano,

ABSTRACT

This research aimed to determine the methods to reduce cadmium levels in cocoa beans during post-harvest, through acidifying and chelating methods, as well as, predrying and washing. The evaluated treatments were HCL at pH 3.0, HCL at pH 3.5, HCL at pH 4.0, EDTA, C₆H₈O₇, washing, predrying and a control. Beans were immersed 60 minutes for the acidifying and chelating treatments, while for the washing treatment beans were immersed in distilled water, washed, and then, they continued with their fermentation and drying process. The predrying treatment consisted of taking the fresh beans from the cob, and subsequently they were exposed to the sun for 60 minutes, afterward they continued their post-harvest process. Cadmium content of the beans was determined in the soil and water laboratory at the National Institute of Agriculture Research (INIAP) in Pichilingue. The eight treatments were arranged in a complete randomized design with three replications. Analysis of variance was applied and means were compared by Tukey at 5%. Results showed that beans' cadmium content was significantly influenced ($p < 0.05$) by washing (0.43 mg Cd kg⁻¹) and predrying (0.60 mg Cd kg⁻¹), this represents a reduction of 49.2 and 28.6% respectively, in relation to the control, in addition, it did not have any impact on the physical and sensorial quality of cocoa liquor. Acidifying and chelating were not significant on reducing cadmium content.

Keywords: Cadmium, post-harvest, acid media, bean pollution

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Ecuador es el principal proveedor de cacao fino en el mundo, en 2015 exportó 260 000 toneladas de cacao, teniendo en cuenta que el 88 % fue granos secos y el 12 % semielaborados, de los cuales el 29 % de grano y el 11 % de semielaborados tienen como destino Europa (ANECACAO, 2015).

Esta producción exportable se encuentra amenazada, debido a la presencia de metales pesados (cadmio), en suelos, planta, mazorca de cacao, pero principalmente en almendras de cacao, poniendo en riesgo la comercialización. El Codex Alimentarius actualmente establece para la Unión Europea niveles de cadmio para: Chocolate semiamargo 0.3 ppm/kg; chocolate amargo 0.8 ppm/Kg (Codex Alimentarius, 2016).

Mite, Carrillo y Durango (2010) indican que los altos contenidos de cadmio (Cd) en almendras de cacao, en las provincias de El Oro, Santa Elena y Orellana con valores promedios de 1.35; 1.32 y 1.15 mg Cd kg⁻¹ de cacao seco, respectivamente, resultaron inferiores a los valores encontrados en fincas de El Oro (4.08 mg Cd kg⁻¹), Guayas (3.57 mg Cd kg⁻¹) y Manabí (3.46) mg Cd kg⁻¹. En todos estos casos, los niveles sobrepasan los límites permitidos por la norma general de contaminantes y toxinas del Codex Alimentarius (2015) que fija como límite máximo 0.8 mg Cd kg⁻¹ para chocolate amargo.

Teniendo en cuenta los valores de cadmio encontrados en muchas huertas cacaoteras del Ecuador, se pone en riesgo la exportación de este producto, sobre todo si se considera que el 1 de enero del 2019 rigen nuevos valores para metales pesados en la Unión Europea. En Ecuador la norma vigente del Codex Alimentarius (2015), no establece valores permitidos de cadmio para cacao en grano, existiendo gran preocupación en toda la cadena productora de este rubro, ya que es principal fuente de ingreso de muchas familias, por lo tanto, plantea la siguiente pregunta, ¿Se están generando alternativas para disminuir la contaminación de cadmio en almendras de cacao, en el proceso poscosecha?

1.2. JUSTIFICACIÓN

El cacao ha sido un cultivo tradicional desde la época de la colonia y ha permitido ser fuente de trabajo de miles de familias, se estima que aproximadamente 600.00 personas se involucran directamente en esta actividad y en algunos casos es considerado el único sostén económico. La contribución en los años 2002-2011 al Producto Interno Bruto (PIB) fue del 0.7 % y al PIB Agropecuario del 6.4 %, se estima que la cadena de cacao participa con el 4 % de la Población Económicamente Activa (PEA) nacional y el 12.5 % de la PEA Agrícola (Maridueña, 2011).

La presencia de metales pesados en Ecuador principalmente el cadmio, se plantea investigar la reducción, mediante la acción de medios ácidos, procesos de lavados y presecado, además la aplicación de agentes quelantes los cuales tienen alta eficiencia de capturar metales (Giannis y Giannis, 2005. Li; Wu; Luo y Christie, 2018.)

Teniendo en cuenta la acción inmovilizadora de cadmio intercambiable de los quelantes se propone removerlo en la etapa de escurrido del cacao paso siguiente de la cosecha, las condiciones que genera el proceso escurrido del cacao permiten crear medios ácidos beneficiosos para disolver el cadmio, lo que sumado a la adición de concentraciones ácidas permitirán la solubilización de metal en las almendras de cacao, de esta manera se creará una oportunidad de reducir el contenido de cadmio en el proceso poscosecha del cacao, manteniendo intactas las alternativas de calidad y de comercialización en los mercados internacionales.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar métodos para reducir niveles de cadmio en almendras de cacao en el proceso poscosecha mediante extracción ácida, agentes quelantes, presecado y lavado.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Probar dos concentraciones de quelantes y tres de medios ácidos para la remoción de cadmio en la etapa de recepción, previo a la fermentación del cacao.
- Determinar el método apropiado de lavado y presecado que contribuya eficazmente en la remoción del cadmio durante la etapa de recepción en el proceso poscosecha del cacao.
- Analizar los perfiles de calidad físicos y sensoriales de almendras de cacao, después de la aplicación de quelantes, medios de acidez, presecado y lavado del cacao.

1.4. HIPÓTESIS

Los quelantes y medios ácidos, el lavado y presecado, contribuyen a disminuir significativamente la cantidad de cadmio en las almendras de cacao.

CAPITULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. CULTIVO DE CACAO

Por muchos años el cacao fue el motor principal de las divisas ecuatorianas antes de la llegada del petróleo, el Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones del Ecuador, PROECUADOR (2013) indica que la actividad era desarrollada principalmente en haciendas de gran tamaño denominadas “Grandes Cacaos”. Con este auge aparecieron los primeros capitales y originó el desarrollo de sectores como la banca, industria y el comercio, esto da indicio a que este rubro se considerara como la Pepa de Oro. Sin embargo, en 1920 plagas como la monilla y escoba de la bruja, la falta de transporte y mercados internacionales, provocaron a la economía ecuatoriana un período de depresión e inestabilidad (Asociación Nacional de Exportadores de Cacao [ANECACAO] 2015).

PROECUADOR (2013) afirma que los principales países exportadores de cacao en grano corresponden a: Costa de Marfil y Ghana, sin embargo, países como Brasil y Malasia, que han ocupado un lugar importante en la producción mundial, no son grandes exportadores debido al significativo tamaño de la industria de transformación nacional. El mismo autor argumenta que en América Latina, existen algunos países productores de cacao fino como Ecuador y República Dominicana, los cuales tienen como destino la Unión Europea.

Organización Internacional del Cacao [ICCO] en el (2016) menciona que las plagas y enfermedades causan graves pérdidas en el rendimiento de la producción de cacao en todo el mundo, el uso de agroquímicos es actualmente inevitable. Mientras tanto, los países consumidores de cacao han expresado su preocupación con respecto a los riesgos para la salud asociados con el uso de agroquímicos en la producción de cacao, teniendo en cuenta estos resultados, algunos países importadores de cacao han promulgado medidas legislativas y reglamentarias sobre las normas sanitarias y fitosanitarias (MSF) que debe cumplir el cacao importado.

Además, menciona que las preocupaciones de seguridad alimentaria que afectan al cacao se relacionan con los residuos de pesticidas y otras sustancias dañinas como la ocratoxina “A” (OTA), los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), los ácidos grasos libres (FFA) y los metales pesados como el plomo y el cadmio.

2.1.1. VARIEDADES DE CACAO

Menda y Pinto (2007) manifiestan que el cacao se clasifica en tres variedades de árboles, la más conocida es la variedad forastero que representa el 90% del cacao producido en el mundo, se encuentra en África del Oeste y Brasil, el segundo es el criollo que produce cacao fino y de aroma cultivado en el Caribe, Venezuela, Nueva Guinea y Papúa, por último, existe la variedad trinitario que es un cruce entre Criollo y Forastero. Mientras que la variedad Nacional es autóctona del Ecuador. Sin embargo, Motamayor, Lachenaud, Da Silva, Mota, Loor y Kuhn (2008) indican que existe una amplia diversidad genética de árboles de cacao y en base a sus resultados propone una nueva clasificación del germoplasma de cacao en 10 grupos principales, como: Marañón, Curaray, Criollo, Iquitos, Nanay, Contamana, Amelonado, Purús, Nacional y Guayana.

2.1.2. COSECHA Y POS COSECHA

El Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias INIAP (2010) recomienda cosechar únicamente frutos maduros, al hacerlo en períodos cortos entre una y otra cosecha hay menor riesgo de pérdida de frutos; además las cosechas deben ser realizadas aproximadamente cada 15 días en época lluviosa y cada 30 días en época seca.

Sánchez (2007) afirma que una vez cosechadas las mazorcas se transportan en cajas de madera, sacos plásticos y chalos, al sitio escogido para su apertura, allí se abren con machete en mano, o golpeándolas contra un machete fijado a dos trozos de madera clavadas en el suelo. Una vez abiertas las mazorcas, las almendras se extraen con los dedos o herramientas especiales diseñadas para este propósito, evitando en lo posible su contacto con superficies metálicas.

Jiménez, Tuz, Quevedo y García (2018) determinan que uno de los factores más importantes en el beneficio de las almendras de cacao es la fermentación y dentro de ella la temperatura durante dicho proceso. Rivera, Mecías, Guzmán, Peña, Medina, Casanova, Barrera y Nivelá, (2012) hace referencia que la calidad química mejora con la reducción de la concentración de compuestos alcaloides y polifenoles, lo que repercute sobre las características organolépticas del cacao tipo Nacional. Braudeau (1970) indica que el tipo de fermentador, el volumen de la masa y el volteo durante el proceso afectan la fermentación y en consecuencia la calidad del grano fermentado.

Enríquez (2010) manifiesta que el tiempo de fermentación del cacao es un factor que contribuye a desarrollar la calidad integral y por ende para cacao criollo el tiempo de fermentación es de uno a dos días; para el complejo nacional por trinitario de tres a cuatro días; y para el cacao trinitario (clon CCN-51) es de cinco a seis días en montones o cajas.

Saltos, Sánchez y Anzules (2006) sugieren que durante la fermentación la masa de almendras se voltea para homogenizar la fermentación. La falta de remoción o su ejecución defectuosa, hace que una gran proporción de la masa de cacao se quede sin fermentar. El volteo debe realizarse a las 24 horas en el cacao Criollo y cada dos días, en el caso de Forasteros y Trinitarios, evitando así la proliferación de mohos y la desecación de las almendras que se encuentran en la superficie. La remoción diaria permite un incremento más rápido de la temperatura, y por lo tanto una fermentación más homogénea y de menor duración.

2.1.3. TIPOS DE FERMENTADORES

Braudeau (1970) señala que el proceso fermentativo se realiza de distintas maneras y los métodos tradicionalmente más utilizados son la fermentación en canastas, cajas o en montones, a continuación, se detallan algunos de ellos:

- **Cajas de madera.** - Es el mejor método para fermentar cacao, además este método de fermentación en cajones de madera permite una

fermentación más controlada. Para su construcción de preferencia se usan maderas blancas como por ejemplo el laurel.

- **Montones.-** Es el método más utilizado por los pequeños y medianos productores. La masa en fermentación se debe cubrir con hojas de plátano para conservar la temperatura y evitar contaminación por hongos.
- **Carros rodantes o corredizas.-** Cumple doble función, como fermentador y como tendal para el secado; artesanalmente se construye con materiales como caña y madera.
- **Sacos.-** Es otro método utilizado por los agricultores, ellos llenan los sacos con el cacao fresco y los cuelgan para que se escurra y se fermenten las almendras. También acostumbran a dejar los sacos amontonados en el piso para iniciar el proceso de fermentación (Moreno y Sánchez, 1989).
- **Cajas Rohan.** Este sistema de microfermentación está diseñado de gavetas con dimensiones de 120 x 80 x 10 cm las cuales tienen una capacidad para 70 kg de cacao en baba. El fondo de estas gavetas debe tener hoyos que sean suficientemente anchos, distanciados uniformemente para permitir tanto la aireación de la masa de grano como el drenaje de los jugos lixiviados durante el proceso de fermentación (Enríquez y Paredes, 1978).

El tipo de microfermentación de las cajas Rohan proviene de África Occidental, específicamente de Ghana, debido que varios investigadores realizaban trabajos sobre la fermentación de cacao, quiénes al percatarse que las mayores concentraciones de la temperatura encontraron en la parte superior de la pila o montón, diseñaron un modelo de cajón con dimensiones de 1.20 x 0.80 x 0.10 m de largo, ancho y altura (INIAP, 2011). Además, con estos antecedentes se han realizado modificaciones de las cajas Rohan de manera que sirvan para fermentar al mismo tiempo varias muestras 20 en una sola caja, obteniendo buenos resultados para los procesos de investigación (INIAP, 2011).

2.1.4. PRESECADO

La técnica del presecado consiste en la eliminación del exceso de jugos mucilaginosos de las almendras de cacao, esta etapa se la realiza al momento de cosechar las mazorcaras de cacao fisiológicamente maduras y exponerlas al sol. Jiménez, Tuz, Quevedo y García (2018) mencionan, que los perfiles físicos y sensoriales del clon CCN-51 y EL clon EET-19 mejoraron considerablemente con la técnica de presecado, expuesto por 18 horas al ambiente en una marquesina de plástico y que posteriormente paso a fermentar, por otro lado Amores y Saltos (2005), indican la influencia del presecado de las almendras de cacao CCN-51 sobre la evolución del pH y porcentajes de fermentación, mostraron niveles del 10 % superior con el proceso de presecado en el porcentaje de fermentación frente a la fermentación clásica. El proceso de presecado es más utilizado en materiales genéticos de cacao con alto contenido de mucilago.

Estudios realizados por Amores, Saltos y Jiménez (2007), donde se determinó la época, métodos de fermentación, presecado en cacao Nacional y CCN-51, se encontraron diferencias en las variables de respuestas físicas y sensoriales, principalmente para el clon trinitario. Con excepciones, los resultados obtenidos proporcionaron evidencia mayoritaria acerca de cambios producidos por la introducción del presecado como práctica de beneficio postcosecha, sobre la expresión del perfil sensorial integral del licor proveniente de almendras de cacao CCN-51, los cambios se basaron principalmente en la modificación de la intensidad de los sabores básicos (cacao, amargor, astringencia y acidez) que forman la plataforma estructural del perfil sensorial integral.

2.1.5. SECADO

Es una práctica que consiste en colocar las almendras de cacao ya fermentadas a la acción directa al calor, ya sea por medios naturales o artificiales, el objetivo de este proceso es reducir el contenido de humedad interior del grano al menos del 7%, con el fin de facilitar su manipulación, conservación y evitar daños en la calidad del cacao por acción de hongos y mohos (Reinel *et al.*, 2016). El secado tiene como objetivo eliminar el exceso de humedad y acidez de las almendras

recién fermentadas de aproximadamente 55 % al 7 %, como garantía para su respectivo almacenaje y comercialización (Sánchez, 2007).

2.1.6. CALIDAD FÍSICA Y SENSORIAL EN ALMENDRAS DE CACAO

La calidad del cacao se define como la clasificación realizada a las almendras de cacao, tomando en cuenta sus características físicas como: apariencia, humedad, contenido de materiales extraños, mohos, insectos, entre otros (Graziani, 2003).

Álvarez, Pérez y Lares (2007) mencionan que entre los parámetros que influyen en la selección de un determinado tipo de cacao por los fabricantes de chocolate, se encuentran aspectos físicos tales como: el tamaño del grano, el porcentaje de cáscara, contenido de grasa, dureza de la manteca, humedad, fermentación y secado. Ruiz, Mera, Prado y Cedeño (2015), mencionan que el contenido de cascarilla es otro parámetro por evaluar, para el cacao a nivel de exportaciones se permite hasta el 16% de testa.

Además del efecto de la fermentación, el perfil sensorial del cacao puede variar en función de la genética de cada árbol y la variación genética de la población de las huertas tradicionales, así como de la interacción genotipo por ambiente (Ribas Gratacós, Sárraga, Guárdia, García y Castellari (2014).

Mite *et al.* (2010) realizaron investigaciones para determinar las concentraciones de cadmio en diferentes partes de la planta desde el suelo, hoja, tallo, almendras de cacao y cáscara obteniendo resultados diferentes en todos los análisis realizados. Pedraza y Huauyusa (2017) determinaron que el tallo presenta mayor contenido de cadmio total, seguido por hojas, raíces, almendras y cáscaras, además el cadmio se distribuye por toda la planta en forma desigual. Según (Gideon *et al.*, 2016) existe una alta correlación en la contaminación de cadmio entre el suelo, el árbol de cacao y las almendras, lo que permite estimar que si un suelo está contaminado con metales pesados pudiera llegar esta contaminación hasta las almendras.

En Ecuador estudios realizados por Mite *et al.* (2010) revelan altos contenidos de cadmio en almendras de cacao en las provincias de El Oro. Santa Elena y

Orellana con valores promedios de 1.35; 1.32 y 1.15 mg Cd kg⁻¹ en cacao seco, respectivamente; sin embargo, los valores máximos encontrados en fincas provienen de El Oro con valores de 4.08 mg Cd kg⁻¹ en la almendra. Le siguen Guayas y Manabí con 3.57 y 3.46 mg Cd kg⁻¹, respectivamente, todos estos niveles sobrepasan los límites permitidos por la norma general de contaminantes y toxinas del *Codex alimentarius* el cual establece niveles de 0.8 mg Cd kg⁻¹ (Codex Alimentarius, 2015).

2.2. METALES PESADOS

El término de metal pesado refiere a cualquier elemento químico metálico que tenga una relativa alta densidad y sea tóxico o venenoso en concentraciones incluso muy bajas. Los ejemplos de metales pesados o algunos metaloides incluyen el mercurio (Hg), cadmio (Cd), arsénico (As), cromo (Cr), talio (Tl) y plomo (Pb), Lucho, Álvarez, Beltrán, Prieto, y Poggi (2005). Los metales pesados se encuentran generalmente como componentes naturales de la corteza terrestre, en forma de minerales, sales u otros compuestos. No pueden ser degradados o destruidos de forma natural o biológica ya que no tienen funciones metabólicas específicas para los seres vivos (Abollino, Berger, Censkowsky, Heid y Milz, 2002).

Los metales pesados son peligrosos porque tienden a bioacumularse en diferentes cultivos. La bioacumulación significa un aumento en la concentración de un producto químico en un organismo vivo en un cierto plazo de tiempo, comparada a la concentración de dicho producto químico en el ambiente; Angelova, Ivanova, Delibaltova e Ivanov (2004). La absorción de metales pesados por las plantas es generalmente el primer paso para la entrada de estos en la cadena alimentaria. La absorción y posterior acumulación dependen en primera instancia del movimiento (movilidad de las especies) de los metales desde la solución en el suelo a la raíz de la planta.

2.2.1. METALES PESADOS EN SUELOS

En los suelos se pueden encontrar diferentes metales, formando parte de los minerales propios; como son silicio (Si), aluminio (Al), hierro (Fe), calcio (Ca),

sodio (Na), potasio (K), magnesio (Mg). También puede encontrarse manganeso (Mn), que generalmente se presenta en el suelo como óxido y/o hidróxido, formando concreciones junto con otros elementos metálicos. Algunos de estos metales son esenciales en la nutrición de las plantas, así son requeridos algunos de ellos como el Mn, imprescindible en el fotosistema y activación de algunas enzimas para el metabolismo vegetal (Mahler, 2003).

Los factores que influyen en la movilización de metales pesados en el suelo son características del suelo: pH, potencial redox, composición iónica de la solución del suelo, capacidad de intercambio (catiónico y/o aniónico), presencia de carbonatos, materia orgánica, textura, entre otras. La naturaleza de la contaminación y el origen de los metales y formas de deposición y condiciones medio ambientales producen acidificación, cambios en las condiciones redox, variación de temperatura y humedad en los suelos (Suquillo *et al.*, 2003).

2.2.2. CADMIO

Según Chávez *et al.* (2016) el cadmio (Cd) es un metal que se encuentra principalmente en la corteza terrestre y siempre se presenta en combinación con el zinc. Es ampliamente utilizado en la industria. Se considera un contaminante y es liberado al ambiente como subproducto de la extracción de cobre, hierro y zinc. La exposición al Cd puede producir una variedad de efectos adversos tanto en el humano como en los animales. Se considera que uno de los mecanismos de toxicidad de este metal es debido, en parte, a las especies reactivas de oxígeno, las cuales pueden actuar como segundos mensajeros y por tanto alterar diferentes vías de señalización.

Mead (2011) manifiesta que el cadmio se almacena principalmente en el hígado y los riñones; la excreción es lenta, con una media de vida muy larga (décadas) en el cuerpo humano; se acumula en la mayor parte de los tejidos durante el envejecimiento. (Manahan, 2000) uno de los indicios más típicos y tempranos de la larga exposición al cadmio es el daño que sufre la función renal muchos agentes que producen a menudo insuficiencia renal, aguda también son capaces de ocasionar lesión tubulointersticial; entre ellos se encuentra el cadmio (Pasquali, 2003).

2.2.3. CADMIO EN PLANTAS DE CACAO

El cadmio y el plomo se encuentran de manera natural en la corteza terrestre en forma de minerales, de donde pueden ser absorbidos por las plantas y tomados de ellas por el ser humano, lo que constituye un riesgo potencial para la salud (Prieto, González, Román y Prieto, 2009). La planta de cacao absorbe metales pesados del suelo y los concentra en las semillas (Augstburger *et al.*, 2002).

Reyes y María (2004) manifiestan que los metales pesados son los que tienen densidad igual o superior a 5 g/cm³ en su forma elemental. Además, su número atómico es superior a 20, excluyendo, los metales alcalinos y alcalino-térreos. La presencia de estos elementos en la corteza terrestre es inferior al 0.1 % y casi siempre menor de 0.01 %.

2.2.4. CADMIO EN ALMENDRAS DE CACAO

El cadmio en el suelo puede tener origen natural o antrópico, pero independientemente de ello las plantas lo absorben y pueden acumularlo en distintas estructuras y propiedades. Esta situación se presenta en el cacao con acumulación importante en sus almendras y hojas (Castebianco, 2018) y dado que la mayoría de los productos derivados del cacao son consumidos por niños se hace necesario minimizar la presencia de estos metales en el producto final (Codex Alimentarius, 2015).

Castebianco (2018) refiere que el cadmio en el fruto del cacao se constituye de manera desigual, en el Ecuador se ha encontrado que la mayor cantidad de cadmio se acumula en el jugo y la pulpa (mucílago) del cacao. Este Cd puede moverse hacia la testa y la almendra del cacao y terminar finalmente en el chocolate. Estrategias sencillas tales como lavar la pulpa más grano antes del proceso de fermentación, puede eliminar cantidades importantes de contaminación sin afectar la calidad del grano.

2.3. MECANISMOS DE ACCIÓN DE QUELANTES EN LA MOVILIZACIÓN Y REMEDIACIÓN DE CADMIO

La fitorremediación puede dividirse en distintos tipos y categorías, la fitorremediación asistida por agentes quelantes (fitoquelación), que se basa en la aplicación de agentes quelantes como el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), para atrapar y solubilizar los metales disponibles en el suelo, seguido de una acumulación pasiva de los complejos metálicos en las partes aéreas de las plantas en la corriente de transpiración (Ballesteros, 2011).

2.3.1. QUELANTES

Los quelantes son compuestos heterocíclicos formados por reacción de un ion metálico como ion central, con dos o más grupos funcionales del mismo ligando, y que las quelonas son los ligantes quelantes capaces de formar iones hidrosolubles y complejos del tipo 1:1, con iones metálicos (Pérez y Azcona 2012).

El efecto quelato es la capacidad de los ligandos multidentados de formar complejos metálicos más estables que los que pueden formar ligandos monodentados similares a los primeros, dándose un efecto entrópico favorable a dicha formación.

2.3.2. QUELANTES INTRACELULARES

Navarro, Aguilar y López (2007) indican que a nivel intracelular los metales forman complejos con un ligando existente o sintetizado, que pueden ser ácidos orgánicos, algunos aminoácidos, metalotioneínas y fitoquelatinas, siendo los dos últimos los más importantes.

2.3.3. METALOTIONEÍNAS

Son proteínas de bajo peso molecular (<40 kDa) que crecen de aminoácidos aromáticos y que pueden ser sintetizados por las bacterias, plantas, hongos, invertebrados y mamíferos; también se conocen como pelipéptidos ricos en cisteína codificados genéticamente. Estas proteínas contienen largas fracciones

de residuos de cisteína y muestran alto contenido metálico con iones coordinados en grupos metal-tiolato (Navarro *et al.*, 2007).

2.3.4. FITOQUELATINAS

Braz (2005) dice que estas moléculas son péptidos sintetizados enzimáticamente que juegan un papel importante en la homeostasis y detoxificación de metales pesados. Son de bajo peso molecular (<10 kDa), consisten en tres aminoácidos: cisteína, glicina y ácido glutámico. Las fitoquininas (FQs) derivan del glutión y se polimerizan para formar péptidos secuestradores de metales pesados en muchas especies de plantas y microorganismos. La síntesis de fitoquelatinas es citoplásmica, comienza con la respuesta de la planta a un metal pesado por la activación de la enzima fitoquelatina sintasa, que actúa sobre un sustrato de glutatiión para producir fitoquelatinas.

El mismo autor asume que la principal función de las fitoquelatinas tiene que ver con la destoxificación de metales no esenciales (micronutrientes), particularmente de hierro, cobre y zinc. Una amplia variedad de metales pueden inducir la formación de fitoquelatinas, entre ellos el cadmio, níquel, cobalto, plomo, plata zinc, cobre aluminio, arsénico, selenio y mercurio.

2.3.5. RESPUESTA DE QUELANTES Y MEDIOS ÁCIDOS EN METALES PESADOS

Los metales pesados como el cadmio, plomo, níquel, cromo pueden ser susceptibles a disolverse de sus matrices a través de adición de ácidos orgánicos o inorgánicos (Yu, Ho, Tsai, Chang, y Lee, 1996). Dentro de los procesos químicos de suelos a nivel de la rizósfera, las raíces de las plantas generan distintos ácidos orgánicos de bajo peso molecular, entre los más comunes tenemos, ácido cítrico, fórmico, acético, láctico (Feng, Shan, Zhang, y Wen, 2005).

La acidificación natural de los suelos en estos procesos produce un aumento de la biodisponibilidad de metales pesados como cadmio permitiendo su absorción

y propagación dentro de la cadena trófica (Giannis y Gidakos, 2005). Otro proceso natural que influye en la biodisponibilidad de metales pesados es la formación de complejos de coordinación con metabolitos como polifenoles (Belščak, Durgo, Huđek, Bačun, y Komes, 2018) o materia orgánica (Manahan, 2000), los cuales capturan metales dentro de su matriz o fase.

Ambos procesos naturales han sido emulados para desarrollar técnicas para capturar y extraer metales pesados en suelos, residuos metalúrgicos (Golmaei, Kinnarinen, Jernstrom y Hakkinen, 2018) o sedimentos de ríos (Gu, Yeung y Li, 2017), el lavado de suelos es una técnica convencional que permite extraer metales pesados como cadmio de suelos (Liu, Li, Song y Guo, 2018), la cual consiste en añadir al suelo soluciones de ácidos que disuelvan los metales, sin embargo se generan problemas para extraerlos posteriormente, no obstante se puede separar a través de un pozo de extracción, la extracción de metales pesados simulando los procesos de raíces han demostrado ser muy eficientes en la remoción de cadmio en suelos (Feng *et al.*, 2005).

Otra técnica de extracción de metales es la formación de complejos de coordinación, siendo el ácido etilendiaminotetraacético EDTA el agente acomplejante más utilizado por su bajo coste, alta eficiencia de capturar metales y buena estabilidad de complejos, sin embargo, su baja biodegradabilidad y efectos de inhibiciones microbiológicas son algunos de los problemas asociados a su uso (Giannis y Gidakos, 2005; Li, Wu, Luo y Christie, 2018; Zhang *et al.*, 2013).

La extracción con EDTA ha sido utilizada para extraer cadmio como técnica analítica de hojas, almendras, raíces del cacao como cadmio intercambiable (Chavez *et al.*, 2016). Ambas técnicas de extracción podrían ser una importante solución para extraer el cadmio de almendras de cacao a niveles aceptables para la comercialización dentro de la Unión Europea.

• QUELANTES Y MEDIOS ÁCIDOS COMO INSUMOS

Se sintetizaron dos nuevos derivados de EDTA, el BTDA y PDTA, y se investigaron su constante equilibrio de complejación para ligar metales y sus capacidades selectivas en medios acuosos junto con la de EDTA y CDTA. Los

resultados de la titulación mostraron que el PDTA tenía las constantes de estabilidad más altas para Cu y Ni y la mayor selectividad general para traza de metales sobre cationes principales.

Se realizaron experimentos por lotes para evaluar la eficacia de los derivados de EDTA en la extracción de Cu, Zn, Ni, Pb, Ca y Fe de un suelo contaminado. A pH 7.0, el PDTA extrajo 1.5 veces más Cu que el EDTA, pero solo el 75 % de la cantidad de Ca. Aunque CDTA tuvo mayor poder de quelación de metales pesados, su selectividad general fue menor y comparable a la de EDTA. El BDTA fue el extractor menos eficaz porque sus constantes de estabilidad con metales pesados eran bajas. El PDTA es potencialmente un agente de lavado práctico para suelos contaminados especialmente con trazas de Cu (Zhang *et al.*, 2013). El mismo autor describe que la eficiencia de extracción fue más alta a pH 3 y generalmente disminuyó la extracción a medida que se incrementó el pH.

CAPITULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO

3.1. UBICACIÓN

La presente investigación se realizó en los laboratorios de la unidad de Docencia, Investigación y Vinculación de frutas y vegetales de la Carrera de Ingeniería Agroindustrial, juntamente con la Unidad de Docencia, Investigación y Vinculación de cacao de la Carrera de Ingeniería Agrícola de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, ubicada en Calceta-Bolívar–Manabí.

Los análisis de concentraciones de cadmio y calidad física y sensorial, se los realizó en los laboratorios de la Estación Experimental Tropical Pichilingue del INIAP.

3.1.1. CARACTERÍSTICAS AGROECOLÓGICAS^{1/}

- Temperatura promedio 25 °C
- Humedad relativa 82 %
- Precipitación 970 mm al año
- Heliofanía de 1 185.28 horas/año

3.1.2. DATOS EDÁFICOS^{2/}

- Topografía plana
- pH 7,0
- Drenaje bueno
- Textura

3.2. DURACIÓN

La duración del proyecto fue de doce meses, iniciando en el mes de diciembre del 2018 y culminando en el mes de diciembre del 2019.

➤ 1/Estación Meteorológica Carrera de Agrícola ESPAM MFL, datos meteorológicos octubre 2010-Octubre 2018.
➤ 2/Vera, L. 2013. Estudio de suelo y su fertilidad como base para el manejo sostenible del campus de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí, Ecuador. Tesis. Máster en Nutrición de las Plantas y Biofertilizantes. Calceta- Manabí, EC. p. 10

3.3. MÉTODOS DE REMOCIÓN DE CADMIO

En el presente estudio se probaron siete métodos de remoción de cadmio en almendras de cacao y un testigo.

3.4. DISEÑO DE LOS TRATAMIENTOS

Tabla 1. Diseño de los tratamientos.

Tratamiento	Identificación	Descripción
1	Ácido clorhídrico pH 3.0	Se sumerge la muestra de cacao en baba en una solución de pH 3.0
2	Ácido clorhídrico pH 3,5	Se sumerge la muestra de cacao en baba en una solución de pH 3.5
3	Ácido clorhídrico pH 4.0	Se sumerge la muestra de cacao en baba en una solución de pH 4.0
4	EDTA	Se sumerge la muestra de cacao en baba en una solución de ácido etilendiaminotetraacético
5	Ácido cítrico	Se sumerge la muestra de cacao en baba en una solución de ácido cítrico
6	Lavado	La muestra de cacao en baba se lavó con agua limpia, para remover parcialmente el mucílago
7	Presecado	La muestra de cacao en baba (sin lavar) se colocó por una hora directamente al sol
8	Testigo	La muestra de cacao en baba se colocó directamente al fermentador

3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental utilizado fue un diseño completamente al azar (DCA), ocho tratamientos y tres repeticiones.

Tabla 2. Esquema del análisis de varianza.

Fuente de variación	Grados de libertad
Tratamientos t-1=8-1	7
Error experimental	16
Total	23

3.6. UNIDAD EXPERIMENTAL

Se utilizó 2.7 Kilogramos de cacao en baba, que equivale a 1 kilo de cacao seco.

3.7. VARIABLES

3.7.1. VARIABLES INDEPENDIENTES

Métodos de remoción de cadmio en almendras de cacao

3.7.2. VARIABLES DEPENDIENTES

- Niveles de cadmio (mg Cd kg^{-1})
- Características físicas del grano
- Características organolépticas

3.7.3. CONTENIDO DE CADMIO

El contenido de cadmio en las almendras de cacao se midió en (mg Cd kg^{-1}), el análisis se realizó mediante Absorción Atómica por Horno de Grafito siguiendo la metodología de muestreo, digestión y análisis publicado por Acosta y Pozo (2013).

3.7.4. CARACTERÍSTICAS DE CALIDAD FÍSICAS Y SENSORIALES

Las características de calidad, físicas y sensoriales se rigen en función de la norma INEN 176, a continuación, se mencionan las características físicas:

- **Almendras bien fermentadas**, con apariencia hinchada y se separan fácilmente del cotiledón y su coloración es marrón.
- **Almendras medianamente fermentadas**, testa medianamente suelta y color medianamente marrón.
- **Almendras violetas**, la apariencia interna es compacta, desarrollan un sabor astringente y ácido.
- **Almendras pizarras**, carecen de fermentación, apariencia compacta con sabores amargos y astringentes, el color gris pizarra negruzco.
- **Almendras mohosas**, contaminadas por mohos.
- El porcentaje de fermentación total se obtuvo sumando los porcentajes de almendras bien fermentadas y medianamente fermentadas.

Las características de calidad organoléptica del licor de cacao analizadas fueron las siguientes:

- **Cacao**, describe el sabor típico a granos de cacao bien fermentados y tostados.
- **Amargo**, sabor fuerte, generalmente debido a la falta de fermentación, Se percibe en la parte posterior del paladar o en la garganta, se lo relaciona con el café, cerveza caliente y la toronja.
- **Ácido**, se la describe como un sabor ácido, debido a la presencia de ácidos volátiles y no volátiles y se la percibe a los lados y al centro de la lengua.
- **Astringente**, más que un sabor es una sensación que causa una contracción de la superficie de las mucosas de la boca, dejando una sensación seca y áspera en la lengua.
- **Floral**, son aquellos licores con sabor y aroma a flores de jazmín y cítricos, casi perfumado.
- **Frutal**, caracterizan licores con sabor a fruta madura (guineo maduro). Esto describe una nota de aroma a dulce agradable.
- **Nuez**, se describe como un sabor similar a la nuez y maní, característico de los cacaos tipo Criollos y Trinitarios.
- **Dulce**, este sabor es percibido en la punta de la lengua.

3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó análisis descriptivo que incluyo el cálculo de las medias \pm intervalo de confianza ($\alpha=0.05$), el análisis de varianza en un DCA, de ocho tratamientos con tres repeticiones; la separación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey (95 % de confianza) y el análisis de correlaciones y regresiones, para explicar las relaciones con las variables en estudio.

3.9. MANEJO DEL EXPERIMENTO

El procedimiento estuvo distribuido en las siguientes etapas: Colecta de muestras, soluciones ácidas, soluciones con quelantes, presecado de la muestra, lavado de la muestra, fermentación del cacao, secado del cacao y registro de las variables de respuesta, cada etapa se describen en la (figura 1).

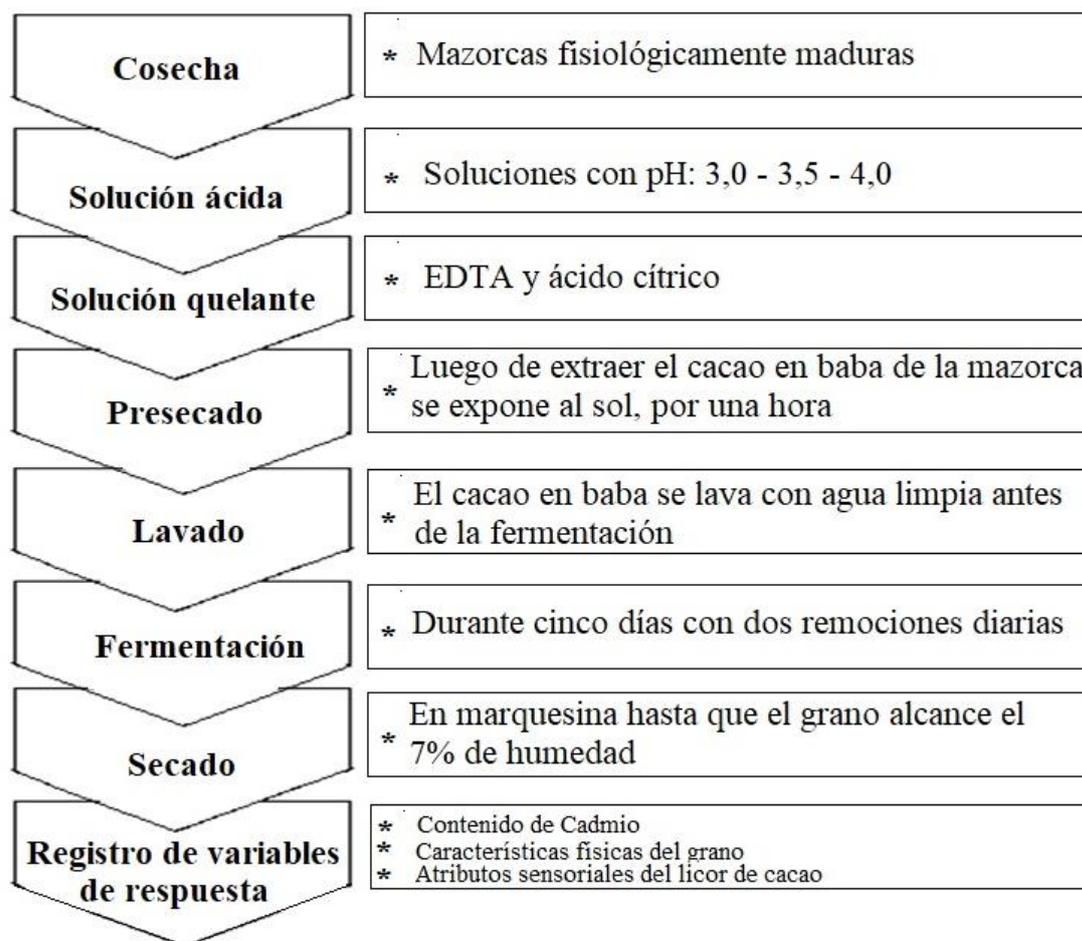


Figura 1. Procedimiento experimental.

3.9.1. COLECTA DE LAS MUESTRAS

Las muestras de cacao se tomó de una sola finca seleccionada por parte de la Corporación Fortaleza del Valle, ubicada en el sector Mocal de la Parroquia Canuto, las mazorcas de cacao son de tipo nacional, híbridos, de alta heterogeneidad en el fenotipo, el muestreo se realizó al azar, en estado fisiológicamente maduras como se muestran en la (figura 2), la cosecha se realizó en la época de lluvia, en esta finca se han realizado análisis de cadmio y los resultados sobrepasaron los niveles permitidos de cadmio, se trabajó con 480 mazorcas de cacao, que se convirtió en 24 kg de cacao seco, teniendo en cuenta que, el promedio del índice de mazorca (cantidad de mazorcas que completan un kilogramo de cacao seco), es de 20 mazorcas igual a 2.7 kilogramo de cacao en baba o 1 kg, de cacao seco.



Figura 2. Muestras de cacao colectado distribuidas por tratamiento.

3.9.2. SOLUCIONES DE MEDIOS ÁCIDOS

El estudio de la influencia del pH se realizó mediante un proceso de extracción, lixiviación y percolación, el cual consiste en separar el metal de las almendras de cacao (2.7 kg), mediante un solvente en este caso son los medios ácidos, el proceso inicio colocando en una bolsa de malla de nylon las muestras de cacao y posteriormente fueron sumergidas hasta que estuvieron completamente cubiertas todas las almendras de cacao en una solución de ácido clorhídrico 0.1 Molar ajustado en tres niveles de pH: 3.0, 3.5 y 4.0 con tres réplicas, por un tiempo de 60 minutos.

3.9.3. SOLUCIONES DE QUELANTES

La solución con quelantes EDTA, se procedió a pesar 50 gramos, el cual se disolvió en un litro de agua destilada, sumergiendo la muestra de cacao en baba (2.7 Kg.) por 60 minutos, luego se escurrió y se colocó en las cajas de microfermentacion. Para preparar la solución con el ácido cítrico ($C_6H_8O_7$) se pesó 31.72 g, mezclando con un litro de agua hasta su completa dilución, luego se sumergió la muestra de cacao (2.7 Kg), durante 60 minutos, que posteriormente se dejó escurrir hasta quedar sin la solución y finalmente se colocó en la caja de madera de microfermentacion tipo Rohan.

3.9.4. PRESECADO Y LAVADO

En el proceso de presecado se pesó la muestra (2.7 Kg.) y se colocó directamente sobre el cemento al contacto directo con el sol, bien distribuido durante 60 minutos, removiendo en dos ocasiones y luego colocando sobre la caja de microfermentación. Para el proceso de lavado se pesó la muestra de cacao (2.7 Kg), la que se sumergió en agua hasta cubrir la muestra, agitándola constantemente para remover el mucilago, luego se colocó en una malla de nylon para que se escurra, posteriormente se instaló en la caja de microfermentación.

3.9.5. FERMENTACIÓN DEL CACAO

Dentro del proceso poscosecha del cacao está la etapa de fermentación que debido a la acción de los azúcares y microorganismos se liberan los precursores de aroma y sabor, el método de fermentación que se utilizó para este trabajo fue el de cajas de madera tipo Rohan, como se muestra en la (figura 3), lo que permitió realizar la microfermentación, puesto que cada unidad experimental es de 2.7 kilogramos de cacao en baba que aproximadamente representa un kilo de cacao seco al 7 % de humedad, en esta etapa permaneció 5 días que es el tiempo sugerido por el laboratorio de calidad del INIAP, se realizaron dos remociones, la primera a las 24 horas y la segunda remoción a las 72 horas de iniciado el proceso.



Figura 3. Proceso de fermentación de las muestras de cacao.

▪ **SECADO DEL CACAO**

El proceso de secado de cada unidad experimental se lo realizó por separado, este se inició una vez terminada la fermentación, cada muestra fue colocada en una marquesina de secado de cacao en capas de 5 cm dándole remoción dos veces al día, esta etapa duro 6 días obteniendo resultados del 7 % de humedad que es lo recomendable para poder almacenar y posteriormente procesar según la normativa INEN 176.

▪ **ANÁLISIS DE CONCENTRACIONES DE CADMIO**

Este análisis se realizó el 28 de noviembre 2019, en el laboratorio de aguas y suelo de la Estación Experimental Tropical Pichilingue del INIAP, mediante Absorción Atómica por Horno de Grafito, el paso preliminar de gran importancia es la homogeneización de la muestra después de obtener la almendra de cacao, se la divide en varios fragmentos, con el fin de facilitar su secado debido a su alto contenido de grasa que posee, normalmente se trabaja entre 10 y 20 gramos de muestra para el análisis final

▪ **ANÁLISIS DE CALIDAD FÍSICO Y SENSORIAL DE LAS ALMENDRAS**

El análisis físico y sensorial de las almendras se realizó el 28 de noviembre 2019, en el laboratorio de calidad integral de cacao en la Estación Experimental Tropical Pichilingue del INIAP, la metodología aplicada fue la prueba de corte, que consiste en utilizar 100 almendras de cacao cortadas en forma longitudinal para exponer al máximo la superficie del cotiledón, esto se hizo utilizando una guillotina marca Teserba, B Matthaei Magra 12, que permite realizar esta operación con mayor facilidad, una vez cortado a la mitad la almendra de cacao se examinó una mitad de cada almendra a la luz del día, clasificando el porcentaje de fermentación en función de parámetros físicos como: color del cotiledón, estrías o aberturas dentro del cotiledón, facilidad de romperse el cotiledón en nibs y facilidad de desprenderse el cotiledón de la testa o cascara. El grado de fermentación tiene las siguientes categorías:

Almendras bien fermentadas, almendras con mediana fermentación, almendras violeta (poca fermentación) y almendras pizarras (nada de fermentación).

El análisis sensorial se realizó por parte de un panel de catadores entrenados en el laboratorio de calidad integral de cacao del INIAP Pichilingue, el procedimiento fue el siguiente: cada muestra se colocó en envase debidamente codificado, luego se calentó a 45°C, se distribuyó a cada catador para realizar el análisis correspondiente, posteriormente se registró los resultados de cada perfil en un formato establecido por el INIAP en una escala hedónica, que muestra la escala cuantitativa y cualitativa de intensidad de los valores como se muestra en la (tabla 3).

Tabla 3. Escala hedónica para la evaluación sensorial de los alimentos.

Valores de la escala hedónica	
Cuantitativa	Cualitativa
0	Ausente
1 a 2	Bajo
3 a 5	Medio
6 a 8	Alto
9 a 10	Muy alto

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. REMOCIÓN DE CADMIO EN LA ETAPA DE RECEPCIÓN DEL PROCESO POSCOSECHA DEL CACAO

4.1.1 CONTENIDO DE CADMIO

El contenido de Cd en almendras de cacao fue significativamente ($p < 0.05$) influenciado por los tratamientos probados (tabla 4), donde los tratamientos a base de lavado y presecado mostraron la menor concentración de Cd, con relación al tratamiento control, EDTA y HCl con 3.0 pH, que mostraron la mayor acumulación del metal en los granos. Los tratamientos a base de A. cítrico, HCl con pH 3.5 y 4.0 mostraron concentraciones por encima del nivel crítico permisible establecido por los organismos reguladores (0.6 mg. /kg). Las prácticas de lavado y presecado redujeron el nivel de Cd con relación al tratamiento control en 49.2 y 28.6%, respectivamente. Los tratamientos a base de A. cítrico, HCl con pH 3.5 y 4.0 disminuyeron la concentración de Cd en 17.1, 15.5 y 10.7% en su orden respectivo, con relación al tratamiento testigo, mientras que los tratamientos a base de EDTA y HCl con 3.0 de pH incrementaron el nivel de Cd en 0.8 y 10.7% con relación al testigo.

Tabla 4. Contenido de cadmio en almendras de cacao.

Fuente de Variación	Contenido de cadmio mg Kg ⁻¹
Lavado	0.43 a
Presecado	0.60 ab
Ácido cítrico	0.70 abc
Ácido clorhídrico pH 3.5	0.71 bc
Ácido clorhídrico pH 4.0	0.75 bc
Testigo	0.84 bc
EDTA	0.85 bc
Ácido clorhídrico pH 3.0	0.93 c
p-valor	** 0.0003
C.V. %	13.48

**** Altamente significativa**

Nota: La tabla es de elaboración propia producto de la investigación del proyecto, letras distintas difieren estadísticamente de acuerdo con el test de Tukey al 95% de confianza

Los resultados obtenidos de esta investigación coinciden con la información citada por Mite et al. (2010), donde mencionan que el mayor contenido de Cd se encuentra en la parte mucilagosa de la almendra de cacao en fresco, que, al realizar aplicaciones de lavado y presecado permitirán retirar el mucilago antes que pueda entrar al interior de la almendra, sin embargo, Chávez *et al.* (2015) mencionan en su investigación que el mayor contenido de cadmio lo encontró en el cotiledón y en menor proporción en la cáscara del grano seco, con estos resultados se evidencia claramente la introducción del metal al no ser retirado en el mucilago.

El tratamiento con EDTA, con un valor numérico mayor en contenido de cadmio comparado con el testigo, estadísticamente no presenta diferencia significativa ($p > 0.05$) por lo tanto el tratamiento con EDTA no fue eficiente en la remoción de cadmio. En el tratamiento con HCl pH 3.0 incrementó el contenido de cadmio en las almendras de cacao, situación que puede explicarse por fenómeno osmóticos durante el proceso, es decir, la concentración del ácido clorhídrico permite la solubilización del cadmio contenido en la baba de cacao. Los iones de cadmio se encontraron en zonas de alta concentración rodeando a las almendras, el contenido de cadmio dentro de la almendra es menor que en el exterior, la diferencia de concentración de iones Cd^{2+} pueden producir un desequilibrio osmótico permitiendo que ingresen en las almendras incrementado la concentración del cadmio.

Los resultados a pH 3.0 abren la posibilidad de modificar el tratamiento y el reactor para optimizar el proceso a un sistema de percolación, donde la solución de lavado puede ser una mezcla de iones Ca^{2+} que reemplacen al Cd^{2+} Chávez *et al.* (2015) permitiendo una competencia entre iones donde por tamaño de ion/carga eléctrica favorecerá a los iones Ca^{2+} con ácido clorhídrico o nítrico.

4.2. ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE ALMENDRAS DE CACAO

Podemos notar el tratamiento con EDTA muestra diferencia estadística comparado con los demás tratamientos, manteniendo su diferencia en fermentación total, fermentación media, almendras violetas y almendras pizarras

con valores promedio de 58.67, 49.33, 17.00 y 24.33% respectivamente, por tanto, se demuestra la acción antibacteriana que tiene el quelante EDTA. Las medias para los tratamientos obtenidos mediante cacao lavado y cacao presecado, para la fermentación total y fermentación media, fueron más altos, además niveles bajos de almendras violetas. Los tratamientos sometidos con ácido clorhídrico y ácido cítrico, a pesar de que recibieron niveles aceptables de fermentación, resultaron ser poco prácticos a la hora de la aplicación. (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis físico en almendras de cacao.

Fuente Variación	Peso de 100 semillas (gr.)	% de fermentación					
		Buena	Mediana	Total	Violeta	Pizarra	Moho
HCL 3.0	125.0 ab	18.6 ab	70.3 b	89.0 bc	5.7 a	4.0 a	1.3 a
HCL 3.5	123.3 ab	17.3 ab	66.0 ab	83.3 b	8.0 a	7.7 a	1.0 a
HCL 4.0	119.0 a	26.3 b	66.0 ab	92.3 bc	5.3 a	2.3 a	0.0 a
EDTA	128.3 ab	9.3 a	49.3 a	58.7 a	17.0 b	24.3 b	0.0 a
Ácido cítrico	131.3 ab	20.0 ab	68.3 b	88.3 bc	6.7 a	5.0 a	0.0 a
Testigo	124.0 ab	13.3 ab	74.0 b	87.3 bc	8.3 a	4.3 a	0.0 a
Lavado	146.0 b	22.0 ab	73.0 b	95.0 bc	2.3 a	2.0 a	0.7 a
Presecado	125.0 ab	21.0 ab	77.3 b	98.3 c	1.3 a	0.0 a	0.3 a
p-valor	* 0.0283	* 0.041	** 0.0019	** 0.0001	** 0.0003	** 0.0001	^{NS} 0.1035
C.V. %	6.3	29.4	9.11	5.95	42.98	52.61	125.08

^{NS} No significativo al 5% de probabilidades

* Significativa

** Altamente significativa

Nota: La tabla es de elaboración propia producto de la investigación del proyecto, letras distintas difieren estadísticamente de acuerdo con el test de Tukey al 95% de confianza

Todos La norma INEN 176 indica que la categoría Arriba Superior Ecuador A.S.E. es la menos exigente para la exportación de granos de cacao, con el porcentaje mínimo de 53 % total de fermentación para almendras, violetas máximo 24 % y para almendras pizarra máximo 18 %, se destaca que todos los tratamientos de esta investigación sobrepasan lo estipulado por la norma, a excepción del tratamiento con EDTA donde la variable pizarra sobrepasa los niveles permitidos.

Los tratamientos cacao lavado y cacao presecado en la variable total fermentación obtuvieron promedios superiores al testigo 95 % y 98 %, superando

numéricamente al testigo 87.33 % en ambos casos y cacao presecado muestra ser diferente estadísticamente.

4.3. ANÁLISIS SENSORIAL DE LICOR DE CACAO

En el perfil de sabor del cacao se encontraron niveles bajos y medios de calidad en la escala evaluada como se muestra en la (tabla 6), es importante mencionar que la finca fue seleccionada en función del contenido de cadmio, sin embargo, destacan perfiles positivos que lo sitúan dentro de la variedad fino de aroma.

Tabla 6. Análisis sensorial de almendras de cacao.

F.V.	Perfiles sensoriales							
	Cacao	Amargo	Astringente	Ácido	Frutal	Floral	Nuez	Dulce
HCL 3.0	3.67 ab	4.50 ab	3.33 a	2.5 a	3.17 a	1.33 a	1.17 a	0.33 a
HCL 3.5	4.00 ab	4.50 ab	3.83 a	2.00 a	2.67 a	1.83 a	1.17 a	0.50 a
HCL 4.0	3.67 ab	3.67 ab	2.5 a	1.83 a	2.83 a	0.83 a	0.83 a	0.67 ab
EDTA	2.83 a	5.00 ab	3.33 a	2.17 a	2.83 a	2.33 a	0.17 a	0.50 a
Ácido cítrico	2.67 a	5.17 b	3.33 a	2.17 a	2.33 a	0.67 a	1.00 a	0.00 a
Testigo	3.17 ab	3.67 ab	4.17 a	2.5 a	3.33 a	1.00 a	0.83 a	1.00 ab
Lavado	4.67 b	2.50 a	2.33 a	1.67 a	4.33 a	2.17 a	1.33 a	2.00 b
Presecado	4.33 ab	3.83 ab	2.83 a	2.67 a	3.50 a	1.67 a	1.00 a	1.33 ab
p-valor	0.0118*	0.0500*	0.5603 ^{NS}	0.6345 ^{NS}	0.2382 ^{NS}	0.8914 ^{NS}	0.6285 ^{NS}	0.0043**
CV	13.17	22.52	36.69	31.99	27.9	115.46	75.42	63.16

^{NS} No significativo al 5% de probabilidades

* Significativa

** Altamente significativa

Nota: La tabla es de elaboración propia producto de la investigación del proyecto, letras distintas difieren estadísticamente de acuerdo con el test de Tukey al 95% de confianza

Los resultados obtenidos del laboratorio de calidad de cacao del INIAP Pichilingue, permiten determinar que en sabores específicos; frutal, floral y nuez no hay diferencias significativas, entre ninguno de los tratamientos, como hace mención en la (tabla 4), a pesar de que existe diferencia numérica no inciden en sus perfiles de sabor sobre la aplicación de diferentes metodologías para la remoción de cadmio, teniendo en cuenta que estos son los atributos positivos que buscan los chocolateros.

Las variables de sabor, cacao y dulce, en función a los tratamientos con EDTA y ácido cítrico, tuvieron diferencia significativa frente al tratamiento cacao lavado, Según Solórzano *et al.* (2015) la incidencia del porcentaje de almendras violetas y pizarras puede incidir en los perfiles de calidad final de las muestras, debido a que, a medida que disminuye el porcentaje de fermentación, disminuyen los perfiles de sabor. También hubo diferencia estadística entre los tratamientos lavados y ácido cítrico, para la variable básica amargo que presenta medias de 2.5 y 5.17 respectivamente como se menciona en la (tabla 4)

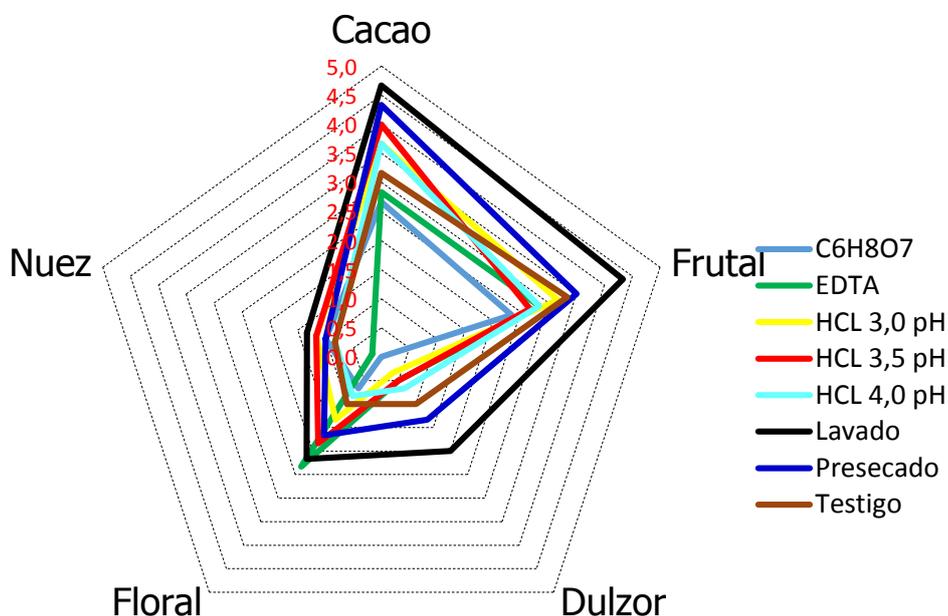


Figura 4. Variables positivas de perfiles de sabor de muestras de cacao.

El tratamiento cacao lavado claramente destaca en todas las variables dentro de la (figura 4), teniendo interesantes perfiles de sabor a cacao, frutal y ligeras notas de dulzor y floral. Para el tratamiento de cacao presecado a pesar de tener menos intensidad para las notas de frutal y dulzor, la variable cacao sigue muy de cerca al tratamiento cacao presecado, considerándose los tratamientos que mejor potenciaron las características de sabor. Después de estos dos tratamientos se destaca el tratamiento con ácido clorhídrico con un pH de 3.5 y 4.0, y posteriormente al testigo que se aproxima a los mejores tratamientos solo en los sabores frutal y dulce.

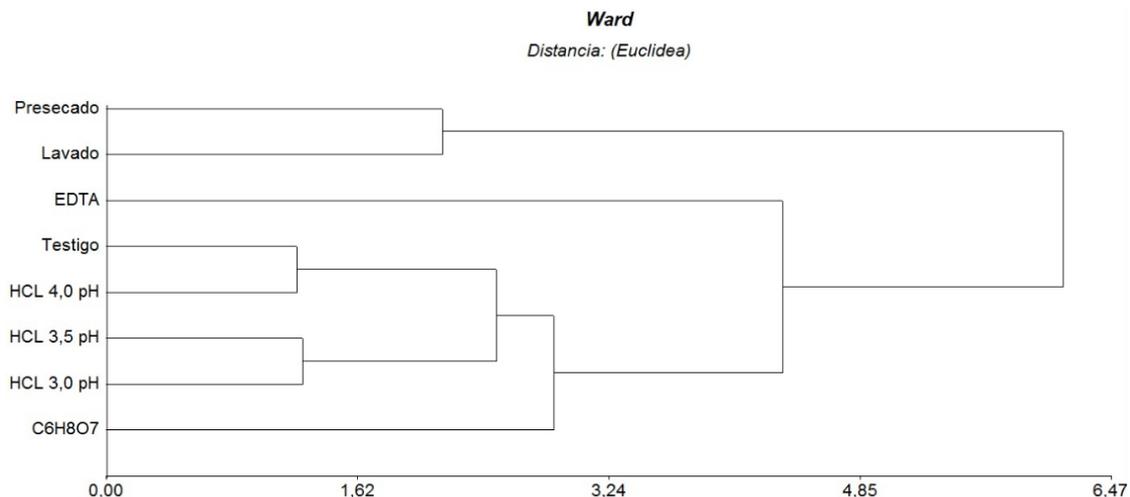


Figura 5. Análisis de conglomerado de muestras de cacao para reducir contenido de cadmio.

En el análisis de conglomerados jerárquicos mostrado en la (figura 5), se evidencian cuatro grupos diferentes, teniendo una relación cercana los tratamientos presecado y lavado, resaltando que son los tratamientos que más removieron cadmio y tuvieron el mejor comportamiento de calidad física y sensorial. Luego se tiene el tratamiento con EDTA, como un grupo completamente independiente. Otros tratamientos que se aproximan al testigo son independientes al tratamiento HCl 4.0 pH. El tratamiento ácido cítrico es un grupo distinto a todos.

La matriz de la (tabla 7) se muestra que las correlaciones fueron estadísticamente no significativas ($p > 0.05$), lo cual indica que las variables no se asocian estadísticamente entre sí. Sin embargo, se puede notar que numéricamente a medida que se disminuye el porcentaje de fermentación se incrementa el contenido de cadmio en el cotiledón.

El contenido de cadmio se relaciona negativamente con el % de fermentación total ($r = -0.425$) y con los sabores a cacao ($r = -0.404$) y dulce ($r = 0.407$). La correlación entre sabor a cacao y frutal es significativa ($r = 0.636$), entre cacao y dulce ($r = 0.721$), entre frutal y dulce ($r = 0.813$). El peso de 100 almendras y el porcentaje total de fermentación no mostraron correlaciones significativas ($p > 0.05$).

Tabla 7. Matriz de correlaciones entre características físicas del grano y atributos sensoriales en cacao.

Tratamientos	Cd (mg kg ⁻¹) cotiledón	Peso 100 almendras	% Total Fermentación	Cacao	Frutal	Floral	Dulce
Cd (mg. kg ⁻¹) cotiledón	1						
Peso 100 almendras	-0.590*	1					
% Total Fermentación	-0.425 *	0.128	1				
Cacao	-0.404 *	0.125	0.395	1			
Frutal	-0.283	0.186	0.099	0.636 *	1		
Floral	-0.037	-0.038	-0.223	0.160	0.363	1	
Nuez	-0.057	0.191	0.320	0.183	0.013	-	1
						0.188	
r0.05= 0.404			Sig. 95 %				

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

La evidencia experimental permite determinar las siguientes conclusiones:

- Mediante extracción ácida y el uso de agentes quelantes, presecado y lavado se redujo significativamente los niveles de cadmio en almendras de cacao, en la etapa de poscosecha.
- El lavado y presecado de los granos, disminuyó el contenido de Cd en 49.21 y 28.6%, respectivamente.
- La concentración de quelantes más adecuada para disminuir el cadmio fue el ácido cítrico, tuvo una disminución del 17.1 %.
- El medio ácido que favorece significativamente la reducción de cadmio, en la etapa de recepción, fue la solución con ácido clorhídrico en un pH de 3.5 y estuvo en 15.48 %.
- El uso de acidificantes, productos quelantes, lavado y presecado, no tuvo ningún efecto detrimental sobre la calidad física y sensorial del licor de cacao con la excepción del EDTA.

5.2. RECOMEDACIONES

- Validar los mejores tratamientos con fines de mejorar la respuesta en la reducción de cadmio en almendras de cacao.
- Difundir los resultados obtenidos con lavado y presecado en reducción de cadmio a nivel de centros de acopio de cacao.
- Combinar los tratamientos con mejores resultados en la disminución de cadmio.
- Establecer protocolos del manejo poscosecha del cacao, en función de los mejores tratamientos que permitieron mayor reducción de cadmio.

BIBLIOGRAFÍA

- Amores, F. y Saltos, A. (2005). Influencia del presecado de las almendras sobre la evolución del pH y porcentajes de fermentación durante la época seca en las variedades de cacao ccn-51 y nacional. INIAP, Pichilingue.
- Ana Belščak, C., Ksenija, D., Ana Huđek, Višnja Bačun-Družina y Komes, D. (2018). Overview of polyphenols and their properties. In C. M. Galanakis (Ed.), *Polyphenols: Properties, Recovery and Applications*. p. 18-19: Publishing publications.
- ANECACAO (2015). Asociación nacional de exportadores de cacao Reporte ejecutivo de estadísticas de exportación. (En línea). Consultado 10 de octubre de 2018. Disponible en: <http://www.anecacao.com>
- Álvarez, C., Pérez, E. y Lares, M. (2007). Caracterización física y química de almendras de cacao fermentadas, secas y tostadas cultivadas en la región de Cuyagua, estado Aragua. VE. *Revista Agronomía Tropical*, 57 (4): 2-9.
- Angelova, V., Ivanova, R., Delibaltova, V. y Ivanov, K. (2004). Bio-accumulation and distribution of heavy metals in fibre crops (flax, cotton and hemp). *Industrial Crops and Products* 19: 197-205.
- Abollino, O., Berger, J., Censkowsky, U., Heid, P. Milz, J. (2002). Agricultura Orgánica en el trópico y subtropico. En: Guía de 18 cultivos. 1ra Edición. Alemania. 24 p.
- Augstburger, F., Aceto, M., Malandrino, M., Mentaste, E., Sarzanini, C. y Barberis, R. (2002). Distribution and Mobility of Metals in Contaminated Sites. Chemometric Investigation of Pollutant Profiles. *Environmental Pollution*, 119: 177.
- Ballesteros, J. (2011). Determinación de la eficacia de la *Azolla caroliniana* como matriz de hiperacumulación de metales pesados cuantificados. Tesis de ingeniero en Biotecnología de los recursos naturales. UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA DEL ECUADOR, Quito. EC. p 112.
- Braudeau, J. (1970). El cacao. Traducido por Hernández C. Editorial Blume, Barcelona, España. p. 28.
- Braz, J. (2005). Phytochelatin. Department of biology and earth sciences. *Plant physiol*, 17(1): 65-78.
- Castebianco, J. (2018). Técnicas de remediación de metales pesados con potencial aplicación en el cultivo de cacao. Universidad Politécnica Salesiana, Ecuador. *Revista de Ciencias de la Vida*, 27(1): 21-35.
- CODEX Alimentarius. (2015). "Norma general para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos. CODEX STAN193-1995."

- Chavez, E., He, Z., Stoffella, P., Mylavarapu, R., Li, Y. y Baligar, V. (2016). Chemical speciation of cadmium: An approach to evaluate plant-available cadmium in Ecuadorian soils under cacao production. *Chemosphere*, 150: 57-62. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.02.013.
- Feng, M. H., Shan, X.Q., Zhang, S., y Wen, B. (2005). A comparison of the rhizosphere-based method with DTPA, EDTA, CaCl₂, and NaNO₃ extraction methods for prediction of bioavailability of metals in soil to barley. *Environ Pollut*, 137(2):231-240. doi: 10.1016/j.envpol.2005.02.003.
- Enríquez, G y Paredes, A. (1978). Notas sobre el cultivo de cacao. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. Instituto interamericano de Ciencias Agrícolas. p. 5-39.
- Enríquez, G. (2010). Cacao orgánico: Guía para productores ecuatorianos. 2 ed. Quito. EC. 407 p.
- Gideon, R., Chang, I; Bekele, I., Bekele, F., Wilson, L., Majarah, K., Harrinanan L. (2016) Relationships between Cadmium in Tissues of Cacao Trees and Soils in Plantations of Trinidad and Tobago.
- Giannis, A., y Gidaracos, E. (2005). Washing enhanced electrokinetic remediation for removal cadmium from real contaminated soil. *J Hazard Mater*, 123(1-3):165-175. doi: 10.1016/j.jhazmat.2005.03.050.
- Golmaei, M., Kinnarinen, T., Jernstrom, E., y Hakkinen, A. (2018). Extraction of hazardous metals from green liquor dregs by ethylenediaminetetraacetic acid. *J Environ Manage*, 212: 219-227. doi: 10.1016/j.jenvman.2018.01.078.
- Gu, Y., Yeung, A. T., y Li, H. (2017). Enhanced electrokinetic remediation of cadmium-contaminated natural clay using organophosphonates in comparison with EDTA. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, volumen 26 : p. 2. doi: 10.1016/j.cjche.2017.10.012.l,^o
- Graziani, L.F. (2003). Calidad del cacao. En Memorias del Primer Congreso Venezolano del Cacao y su Industria, UCV.EC, (En línea). Formato PDF. Consultado 18 de octubre de 2018. Disponible en: www.Cacao.sian.info.ve/.
- INIAP (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias) (2011) Micro fermentación y análisis sensorial para la selección de árboles superiores de cacao. Quevedo- Los Ríos. EC. Boletín Técnico N° 140. p 13.
- INIAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias). (2010). Poda del cacao. Boletín N°378. INIAP. Estación Experimental Litoral Sur, EC. p. 11.
- Jiménez, J.C., Tuz Guncay, G., Quevedo Guerrero, J.N. y García Batista, R.M. (2018). Presecado: Su efecto sobre la calidad sensorial del licor de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Revista Científica Agroecosistemas*, 6(2):63-73. Disponible en <http://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes/index>.

- Li, Z., Wu, L., Luo, Y. y Christie, P. (2018). Changes in metal mobility assessed by EDTA kinetic extraction in three polluted soils after repeated phytoremediation using a cadmium/zinc hyperaccumulator. *Chemosphere*, 194:432-440. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.12.005.
- Liu, L., Li, W., Song, W. y Guo, M. (2018). Remediation techniques for heavy metal-contaminated soils: Principles and applicability. *Sci Total Environ*, 633:206-219. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.03.161.
- Lucho, C., Álvarez, M., Beltrán, R., Prieto, F. y Poggi, H. (2005). A multivariate analysis of the accumulation and fractionation of major and trace elements in agricultural soils in Hidalgo State, Mexico irrigated with raw wastewater. *Environmental International*, On Line: 0160- 4120-D 2004 doi:10.1016/j.envint.2004.08.002.
- Navarro, J., Aguilar, A. y López, J. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en las plantas. *Revista científica y técnica de ecología y medio ambiente*. p. 10-25.
- Mahler, R. (2003). General overview of nutrition for field and container crops. In: Riley, L.E., Dumroese, R.K., Landis, T.D. Tech Coords. National Proceeding: Forest and Conservation Nursery Associations. 2003 June 9-12; Coeur d'Alene, ID; and 2003 July 14-17; Springfield, IL. Proc. RMRS-P-33.
- Manahan, S.E. (2000). Fundamentals of aquatic chemistry. In c. P. Llc (ed.), *environmental science, technology, and chemistry* (p. 96-98). Boca Raton: CRC Press LLC.
- Maridueña, G. (2011). "Estudio de la microbiota patogénica de "cacao criollo" en cinco provincias de la costa ecuatoriana y evaluación de la efectividad *in vitro* de los bioles locales para su control" (tesis de Maestría en Biotecnología Agrícola) Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil.
- Mead, M. (2011). Confusión por el cadmio. ¿Los consumidores necesitan protección? *Noticias de salud ambiental. Salud Publica Mex* 2011;53:178-185. [Publicado originalmente en *Environ Health Perspect* 2010;118:A528-A534.
- Menda, B. y Pinto, L. (2007). Programa de cacao en el Estado de Lara. Consultado 30 de junio de 2018. Disponible en <http://www.canacacao.org>
- Mite, F, Carrillo, M. y Durango, W. (2010). "Avances del monitoreo de presencia de cadmio en almendras de cacao, suelos y aguas en Ecuador". Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). XII Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo. Ecuador, 2010. Disponible en <http://www.secsuelo.org/wpcontent/uploads/2015/06/6.-Francisco-Mite.-Cadmio.-INIAP.pdf>.

- Moreno, L. y Sánchez, J. (1989). Beneficio del Cacao. Fundación Hondureña de Investigaciones Agrícolas. Vol. 6. p 26.
- Motamayor, J., Lachenaud, P., Da Silva, E., Mota, J., Loor, R. y Kuhn, D. (2008) Geología y Genética de Población Diferenciación del Chocolate Tree amazónica (*Theobroma cacao* L). *PLOS ONE*, 3 (10): p. 2. e3311. doi: 10.1371/journal.
- ICCO (Organización Internacional del cacao). (2016) informe anual. https://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat_view/1-annual.
- Pasquali, R. (2003). Química ambiental. Buenos Aires. Akadia: Editorial Jorge Samaniego.
- Pedraza, E. y Huayusa, M. (2017). Distribución del contenido de cadmio en los diferentes órganos del cacao CCN-51 en suelo aluvial y residual en las localidades de Jacintillo y Ramal de Aspuzana. Huánuco Perú. p. 9. DOI:10.25127/aps.20172.365
- Pérez, P. y Azcona, M. (2012). Los efectos del cadmio en la salud. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 17(3):199-205.
- Prieto, J, González, C., Román, A., y Prieto, F. (2009). Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Trop. Subtrop. Agroecosyst*, 10(1):29 - 44.
- PROEcuador. (2013). Análisis del sector cacao y elaborados. (En línea).EC. Consultado 30 de junio de 2018. Formato PDF. Disponible en <http://www.proecuador.gob.ec>.
- Reyes, E. y María, A. (2004). Contenido de metales pesados tóxicos (níquel, plomo, cobre, cadmio y manganeso) en el cacao de la provincia Monseñor Nouel. Resultados de investigación en cacao. Santo Domingo, DO. 73 p.
- Reynel, V., Loor, O., Bolaños, M. y Tezara W. (2016) Efectos del tipo de secado en la calidad organoléptica del cacao (*Theobroma cacao* L.) en Esmeraldas, Ecuador. *Investigación y Saberes*, V(1): 22-27
- Ribas, A., Gratacós, M., Sárraga, C., Guárdia, D., García, J., Castellari, M. (2014). Stability of phenolic compounds in dry fermented sausages added with cocoa and grape seed extracts. *LWT. Food Science and Technology* 57(1): 329-336.
- Rivera, R; Mecías, F; Guzmán, A; Peña, M; Medina, H; Casanova L; Barrera A y Nivelá, P. (2012). Efecto del tipo y tiempo de fermentación en la calidad física y química del cacao (*Theobroma cacao* L.) Tipo Nacional. *Ciencia y Tecnología*, 5(1):7-2. Disponible en <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4149700.pdf>.

- Ruiz, M., Mera, O., Prado, A., Cedeño, W. (2015). Influencia de la época de cosecha en la calidad del licor de cacao tipo nacional. EC. *ESPAMCIENCIA*, 5(2): p. 4.
- Saltos, A., Sánchez, V., Anzules, A. (2006). Beneficio del cacao. En Taller de entrenamiento en calidad física y organoléptica de cacao. Quevedo-Los ríos. Revista Memorias INIAP. p. 7-10.
- Sánchez, V. (2007). Caracterización organoléptica del cacao (*Theobroma cacao* L.), para la selección de árboles con perfiles desabor de interés comercial. Tesis de pregrado. Ing. Agrónomo. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Quevedo-Los Ríos, EC. p. 2-58.
- Solórzano, E., Amores F., Jiménez, J., Nicklin, C., Barzola, S., (2015) Comparación sensorial del cacao (*Theobroma cacao* L.) Nacional fino de aroma cultivado en diferentes zonas del Ecuador. Revista Ciencia y Tecnología Quevedo, volumen 8 p. 43, disponible <https://biblat.unam.mx/es/revista/ciencia-y-tecnologia-quevedo>
- Uquillo, A., Rigol, A., y Rauret, G. (2003). Overview of the use of Leaching Extraction Tests for Risk Assessment of Trace Metals in Contaminated Soils and Sediments. *Trends in Analytical Chemistry*, 22: 152-159.
- Yu., K.C., Ho., S.T., Tsai., L.J., Chang., J.S. y Lee., S.Z. (1996). Remobilization of zinc from ell-ren river sediment fractions affected by EDTA, DTPA and EGTA. *War. Sci. Tech*, 34:125-113.
- Zhang, T., Liu, J. M., Huang, X. F., Xia, B., Su, C. Y., Luo, G. F., Qiu, R. L. (2013). Chelant extraction of heavy metals from contaminated soils using new selective EDTA derivatives. *J Hazard Mater*, 262:464-471. doi: 10.1016/j.jhazmat.2013.08.069.

ANEXOS

ANEXO 1

ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE CADMIO Y CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE ALMENDRAS DE CACAO

Repetición	Tratamientos	Medios	Cd(mg/Kg) cotiledon	Peso 100 alm	Buena fermentación	Mediana ferment.	Total Ferment.	Violeta	Pizarra	Moho
1	1	HCL 3,0 pH	0,8	126,99	11	76	87	9	3	1
2	1	HCL 3,0 pH	0,95	127,75	24	66	90	3	5	2
3	1	HCL 3,0 pH	1,04	119,91	21	69	90	5	4	1
1	2	HCL 3,5 pH	0,75	126,79	14	71	85	7	7	1
2	2	HCL 3,5 pH	0,54	119,64	18	65	83	9	7	1
3	2	HCL 3,5 pH	0,84	123,13	20	62	82	8	9	1
1	3	HCL 4,0 pH	0,85	116,25	19	65	84	9	7	0
2	3	HCL 4,0 pH	0,6	124,17	31	69	100	0	0	0
3	3	HCL 4,0 pH	0,8	117,22	29	64	93	7	0	0
1	4	EDTA	0,9	125,38	0	53	53	20	27	0
2	4	EDTA	0,75	128,5	16	38	54	16	30	0
3	4	EDTA	0,89	131,33	12	57	69	15	16	0
1	5	C ₆ H ₈ O ₇	0,8	116,94	23	66	89	8	3	0
2	5	C ₆ H ₈ O ₇	0,6	141,93	20	65	85	7	8	0
3	5	C ₆ H ₈ O ₇	0,69	135,24	17	74	91	5	4	0
1	6	Testigo	0,89	112,06	19	69	88	7	5	0
2	6	Testigo	0,79	139,04	9	85	94	4	2	0
3	6	Testigo	0,84	120,95	12	68	80	14	6	0
1	7	Lavado	0,42	140,32	23	74	97	2	1	0
2	7	Lavado	0,4	150,41	24	70	94	3	2	1
3	7	Lavado	0,46	148,49	19	75	94	2	3	1
1	8	Presecado	0,6	115,22	17	81	98	1	0	1
2	8	Presecado	0,6	128,75	19	80	99	1	0	0
3	8	Presecado	0,6	130,82	27	71	98	2	0	0

ANEXO 2

ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DE ALMENDRAS DE CACAO

Repetición	Tratamientos	Medios	Cacao	Acidez	Astringente	Amargor	Frutal	Floral	Nuez	Dulce	Moho
1	1	HCL 3,0 pH	3,5	3	3	5	4	4	1	0,5	0
2	1	HCL 3,0 pH	3,5	2,5	4	5,5	3	0	1	0	0
3	1	HCL 3,0 pH	4	2	3	3	2,5	0	1,5	0,5	0
1	2	HCL 3,5 pH	4	2,5	3,5	4,5	3,5	3,5	0,5	0,5	0
2	2	HCL 3,5 pH	3,5	1,5	3,5	4	2	0	0,5	0	0
3	2	HCL 3,5 pH	4,5	2	4,5	5	2,5	2	2,5	1	0
1	3	HCL 4,0 pH	3,5	2	2,5	3,5	2,5	1,5	1,5	1	0
2	3	HCL 4,0 pH	3,5	2,5	2,5	3,5	2	0,5	0	0	2,5
3	3	HCL 4,0 pH	4	1	2,5	4	4	0,5	1	1	1
1	4	EDTA	3	2,5	4	6	3,5	5,5	0	1	0
2	4	EDTA	3	1,5	2	3	3	0	0,5	0,5	0
3	4	EDTA	2,5	2,5	4	6	2	1,5	0	0	0
1	5	C ₆ H ₈ O ₇	2	3	4	6	2	1	0,5	0	0
2	5	C ₆ H ₈ O ₇	2,5	1,5	2,5	4,5	2,5	0,5	1,5	0	0,5
3	5	C ₆ H ₈ O ₇	3,5	2	3,5	5	2,5	0,5	1	0	0
1	6	Testigo	3	2	2	4	3	2	1,5	1	0

2	6	Testigo	2,5	3,5	5,5	4	2	0	1	0	0
3	6	Testigo	4	2	5	3	5	1	0	2	0
1	7	Lavado	4,5	2,5	4	2,5	4,5	4	1	2	0,5
2	7	Lavado	4,5	2	3	3	3,5	2,5	1	2	0
3	7	Lavado	5	0,5	0	2	5	0	2	2	0,5
1	8	Presecad o	5	2,5	3	4	4	3	0,5	1,5	0
2	8	Presecad o	5	2,5	2	3	3,5	1	0,5	1,5	0,5
3	8	Presecad o	3	3	3,5	4,5	3	1	2	1	0

ANEXO 3

REQUISITO DE CALIDAD DEL CACAO EN GRANO BENEFICIADO PARA LA EXPORTACIÓN

NTE INEN 176

2006-10

TABLA 1. Requisitos de calidad del cacao en grano beneficiado

REQUISITOS	UNIDAD	ARRIBA					CCN51
		A.S.S.P.S	A.S.S.S	A.S.S	A.S.N.	A.S.E.	
Cien granos pesan	g	135-140	130-135	120-125	110-115	105-110	135-140
Buena fermentación (mín.)	%	75	65	60	44	26	***65
Ligera fermentación* (mín.)	%	10	10	5	10	27	11
Violeta (máx.)	%	10	15	21	25	25	18
Pizarroso (pastoso) (máx)	%	4	9	12	18	18	5
Moho (máx.)	%	1	1	2	3	4	1
TOTALES (análisis sobre 100 pepas)	%	100	100	100	100	100	100
Defectuosos (análisis sobre 500 gramos) (máx).	%	0	0	1	3	**4	1
TOTAL FERMENTADO (mín.)	%	85	75	65	54	53	76
A.S.S.P.S	Arriba Superior Summer Plantación selecta						
A.S.S.S	Arriba Superior Summer Selecto						
A.S.S.	Arriba Superior Selecto						
A.S.N.	Arriba Superior Navidad						
A.S.E.	Arriba superior Época						
* Coloración marrón violeta							
** Se permite la presencia de granza solamente para el tipo A.S.E.							
*** La coloración varía de marrón a violeta							

ANEXO 4

LAVADO Y ESCURRIDO DE MUESTRA DE CACAO

