



## Plataforma Multiagencia de Cacao (ATN/RF-17235-RG)

### Producto 6: Estudio de métodos y tiempos de secado y fermentación del cacao sobre el contenido de cadmio

Eduardo Chávez, Byron Moyano



Plataforma Multiagencia  
Cacao 2030-2050





Códigos JEL: Q16

FONTAGRO (Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria) es un mecanismo único de cooperación técnica entre países de América Latina, el Caribe y España, que promueve la competitividad y la seguridad alimentaria. Las opiniones expresadas en esta publicación son de los autores y no necesariamente reflejan el punto de vista del Banco Interamericano de Desarrollo (BID), del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), FONTAGRO, de sus Directorios Ejecutivos ni de los países que representan.

El presente documento ha sido preparado por Eduardo Chávez y Byron Moyano.

Copyright © 2024 Banco Interamericano de Desarrollo. Esta obra se encuentra sujeta a una licencia Creative Commons IGO 3.0 Reconocimiento-NoComercial-SinObrasDerivadas (CC-IGO 3.0 BY-NC-ND) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/igo/legalcode>) y puede ser reproducida para cualquier uso no comercial otorgando el reconocimiento respectivo al BID. No se permiten obras derivadas. Cualquier disputa relacionada con el uso de las obras del BID que no pueda resolverse amistosamente se someterá a arbitraje de conformidad con las reglas de la CNUDMI (UNCITRAL). El uso del nombre del BID para cualquier fin distinto al reconocimiento respectivo y el uso del logotipo del BID no están autorizados por esta licencia CC-IGO y requieren de un acuerdo de licencia adicional. Note que el enlace URL incluye términos y condiciones adicionales de esta licencia.

Esta publicación puede solicitarse a:

**FONTAGRO**

Correo electrónico: [fontagro@fontagro.org](mailto:fontagro@fontagro.org)

[www.fontagro.org](http://www.fontagro.org)



# Tabla de Contenidos

<b>Abstract</b> .....	<b>5</b>
<b>Resumen EJECUTIVO</b> .....	<b>6</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>8</b>
<b>2. Mitigación del cadmio en procesos de postcosecha de cacao</b> .....	<b>10</b>
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>12</b>
3.1 <i>General</i> .....	12
3.2 <i>Específicos</i> .....	12
<b>4. Resultados Y Discusión</b> .....	<b>12</b>
4.1 <i>Cambios generales que ocurren durante la etapa de fermentación</i> .....	12
4.2 <i>Investigación en condiciones controladas</i> .....	15
4.3 <i>Especiación de cadmio (Cd) en las almendras de cacao durante el proceso de fermentación</i> .....	17
<b>5. Conclusiones y recomendaciones</b> .....	<b>20</b>
<b>Referencias Bibliográficas</b> .....	<b>21</b>
<b>Instituciones participantes</b> .....	<b>23</b>



## INDICE FIGURAS

<b>Figura 1. Microorganismos (a) involucrados y compuestos (b) sintetizados durante el proceso de fermentación de cacao. Tomado de De Vuyst &amp; Weckx 2016.....</b>	<b>13</b>
<b>Figura 2. Componentes de la almendra de cacao y explicación de la distribución de cadmio (Cd) en los diferentes tejidos. Fuente: Los autores.....</b>	<b>14</b>
<b>Figura 3. Dinámica de la concentración de cadmio (Cd) durante la etapa de fermentación en dos lotes de cacao comerciales. El cuadro superior de la derecha en ambos gráficos en una magnificación de la concentración de Cd en la semilla (tomado de Vanderschueren et al., 2019) .....</b>	<b>15</b>
<b>Figura 4. Imágenes de la concentración de cadmio (Cd), níquel (Ni) y zinc (Zn) soluble antes (izquierda) y después del proceso de fermentación (izquierda). Las imágenes fueron construidas con ablación laser. Tomado de Vanderschueren et al., 2022) .....</b>	<b>16</b>
<b>Figura 5. Distribución porcentual (%) de cadmio (Cd) soluble en función de Cd total en la almendra (nib) testa y mucílago (contact solution) durante el proceso de la fermentación. Tomada de Vanderschueren et al., (2023) .....</b>	<b>17</b>
<b>Figura 6. Concentración de fitasa después de la incubación y ratio de la concentración de Cd en Almendras tratadas y sin tratar con ácido acético para demostrar la influencia de fitasa en la movilización de Cd secuestrado en la enzima. Tomado de Vanderschueren et al., (2023) .....</b>	<b>18</b>



## ABSTRACT

Cadmium (Cd) is a priority pollutant for securing food quality and safety. The element, which is considered as a trace metal, is toxic at high concentrations and bioaccumulates in the human body causing detrimental health effects, even to the onset of cancer. In non-smoking population, the main exposure route of Cd into the human body is the consumption of contaminated food. For this reason, several health and sanitary agencies impose regulations to control the maximum concentration of Cd in ready-for-sale products. Since January 1st, 2019, the European Union has implemented a regulation that controls the concentration of Cd in chocolates and derivatives. The maximum allowable concentration, which depends on the percentage of cocoa solids, ranges from 0.10 to 0.80 mg kg<sup>-1</sup>. Although the regulation is on the final product and its derivatives, international traders translate the Cd limits to the purchase of cocoa beans, i.e., farmers. Since the publication of the regulation, the interest of the scientific community to find alternatives to manage the Cd problem has increased. The problem exists mainly in Latin American and Caribbean countries, with Ecuador and Colombia being countries with negative repercussions.

Agronomic alternatives have been explored with greater emphasis in the affected countries, but these alternatives are not quick nor cheap to implement therefore the extension of these technology can be limited. Fermentation is a process that converts cacao mucilage into soluble and volatile compounds that are leached out in the fermentation container. This process is mediated by microorganisms that convert low molecular weight compounds into soluble and ethanol, acetic and lactic acid. This process enhances organoleptic attributes in the cacao bean therefore the fermentation is encouraged for cacao quality. During fermentation, the biochemical changes promote Cd mobilization from nib to testa through the biochemical breakdown of phytase. Phytase is a phosphorus-rich enzyme that chelates divalent metals such as Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, and Cd<sup>2+</sup> thus reducing their availability. This enzyme becomes unstable at pH < 5 and temperatures > 55 °C, so immobilized elements are released and become soluble. This occurs with the Cd<sup>2+</sup> immobilized in the phytases. Cd is a non-volatile element at room temperature, so the metal is not lost but mobilized from the seed to the testa. This process can reduce up to 50% of Cd in the seed, so it can be considered a successful strategy if the pH and temperature ranges described above are achieved.

Reducing Cd in fermentation process is possible but key aspects such as a lower pH and higher temperatures are reached. Research related to fermentation has mostly conducted at laboratory scale. It is necessary to test the effect of the parameters described above in field conditions. On the other hand, the increase in temperature and decrease in pH during fermentation processes can negatively affect the organoleptic quality of cocoa beans, so the implementation of mitigation strategies in fermentation must be accompanied by sensory analyses to ensure the quality of the product.

**Keywords:** phytase, fermentation pH, nib, testa, chelates



## RESUMEN EJECUTIVO

Cadmio (Cd) es un contaminante prioritario tanto para asegurar la calidad e inocuidad alimentaria. Este elemento, considerado como un metal pesado, es tóxico en concentraciones elevadas y se bioacumula en el cuerpo humano provocando problemas serios de salud, como cáncer. La principal vía de exposición a Cd, en la población no fumadora, es la ingesta de alimentos contaminados por periodos de tiempo prolongados. Por esta razón, entidades de control de salud y sanitarias imponen normativas para regular las concentraciones del elemento en alimentos. Desde el 1<sup>er</sup> de enero del 2019, la Unión Europea implementa una regulación que controla la concentración de Cd en chocolates y derivados. La concentración máxima permitida está en dependencia del porcentaje de sólidos de cacao y va desde 0.10 a 0.80 mg kg<sup>-1</sup>. A pesar de que la regulación es sobre el producto final y sus derivados, las compañías elaboradoras de chocolate han impuesto límites de Cd para la compra de semillas de cacao. Desde la publicación de la regulación, el interés de la comunidad científica para encontrar alternativas de manejo de la problemática de Cd se incrementó. El problema existe mayoritariamente en países de América Latina y el Caribe, siendo Ecuador y Colombia países con repercusiones negativas.

Las alternativas agronómicas han sido exploradas con mayor énfasis en los países afectados, pero estas alternativas son de largo plazo y tendrán un costo que restringirá su aplicación masiva. La fermentación, por otro lado, ofrece ser una estrategia más controlada y de menor costo que permitiría alcanzar niveles de Cd en las semillas de cacao que permitan su comercialización a mercados regulados. La fermentación es un proceso que convierte el mucílago de cacao en sustancias solubles y volátiles que se pierden de la caja de fermentación. Este proceso es mediado por microorganismos los que se encargan de convertir sustancias de bajo peso molecular en etanol, ácido acético y láctico. Estas sustancias generan cambios organolépticos en las almendras de cacao por lo que la fermentación es un proceso utilizado para realzar atributos de las semillas de cacao. Este proceso puede movilizar el Cd retenido en las semillas hacia la testa (cáscara) por mecanismos de equilibrio bioquímico de las fitasas. Las fitasas son enzimas ricas en fósforo que actúan como inmovilizador de metales divalentes (como Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> y Cd<sup>2+</sup>) lo que reduce su disponibilidad. Estas enzimas pierden estabilidad a pH < 5 y temperaturas > 55 °C por lo que los elementos inmovilizados son liberados y ganan solubilidad. Esto ocurre con el Cd<sup>2+</sup> inmovilizado en las fitasas. El Cd es un elemento no volátil a temperatura ambiente por lo que el metal no se pierde, sino que es movilizado desde la semilla hasta la testa. Este proceso puede reducir hasta el 50% de Cd en la semilla por lo que se puede considerar como una estrategia exitosa, si se alcanzan los rangos de pH y temperatura anteriormente descritos.

La reducción de Cd en los procesos de fermentación es posible siempre que se cumplan con aspectos claves como el descenso de pH e incremento de la temperatura. Las investigaciones relacionadas a la fermentación han sido llevadas a cabo en escala de laboratorio, en su mayoría. Por lo que es necesario probar los efectos de los parámetros antes descritos en condiciones de campo. Adicionalmente, el incremento de la temperatura y descenso de pH durante los procesos



de fermentación pueden afectar negativamente la calidad organoléptica de las semillas de cacao, por lo que la implementación de estrategias de mitigación en la fermentación debe de ser acompañada por análisis sensoriales que aseguren la calidad del producto.

**Palabras claves:** fitasa, pH de fermentación, temperatura de fermentación, semilla de cacao, testa.



## 1. INTRODUCCIÓN

Cadmio (Cd) es un elemento natural en los suelos que es absorbido por las plantas sin tener una función metabólica específica (Campbell, 2006). Una vez dentro de la planta, es acumulada en los tejidos consumibles y entra en la cadena trófica poniendo en riesgo la salud de los consumidores (EFSA, 2011). Sin embargo, para que el riesgo sea elevado, los consumidores deben de estar expuesto a estos alimentos durante periodos prolongados de tiempo y en concentraciones superiores a los que establecen las normativas internacionales (Six & Smolders, 2014). Por esta razón, entidades gubernamentales y sanitarias establecen niveles máximos permitidos en productos para el consumo humano (European Commission, 2014). En este sentido, la Unión Europea monitorea el contenido de Cd en chocolate y otros productos derivados de cacao, desde el 1<sup>er</sup> de enero del 2019. Las concentraciones máximas permitidas oscilan entre 0.10 y 0.80 mg de Cd por kg de producto, en dependencia del porcentaje de sólidos de cacao. Esta regulación pone presión en los países productores en encontrar alternativas de reducción de los niveles de Cd en las almendras de cacao o productos elaborados (Argüello et al., 2023). Estas alternativas pueden ser implementadas en varios eslabones de la cadena productiva, como aplicación de enmiendas de suelo (en campo), estrategias de fermentación (en postcosecha), o mezcla física de almendras con niveles contrastantes de Cd (en centros de acopio) (Vanderschueren et al., 2021).

Las prácticas de mitigación agronómicas pueden tomar mucho tiempo para lograr reducir la concentración de Cd en almendras. Adicionalmente, el costo asociado a la compra y/o elaboración de las enmiendas a aplicar puede ser restrictivo, considerando que los productores de cacao son de pequeña escala y no cuentan con equipamiento para aplicar estos productos. Finalmente, la efectividad de la enmienda a aplicar está dada por el tipo de producto que se aplica y las propiedades de suelo que tenga cada finca (Argüello et al., 2022). Esto haría que prácticamente la solución agronómica sea específica para cada finca lo que dificultaría su aplicación a gran escala.

Por otro lado, las mezclas físicas pueden reducir la concentración de Cd en lotes comerciales, de forma inmediata y viable económicamente. Puede realizarse en las bodegas de exportadores o acopiadores de forma simple siguiendo fórmulas de mezcla que permitan obtener concentraciones de Cd aceptadas en mercados internacionales. Sin embargo, la calidad de lotes comerciales, especialmente a mercados especiales podrían verse afectado y esta estrategia no sería aplicable. Así también, la mezcla física puede ser restrictiva para productores con certificaciones de origen y/o que requieran trazabilidad en sus procesos de comercialización.

La mitigación de Cd en el proceso de fermentación ha sido reportada solo recientemente como una alternativa viable (Vanderschueren et al., 2020). Debido a las variaciones en los procesos de fermentación, orientados siempre a resaltar características organolépticas, los trabajos de investigación en esta línea tienden que ser complejos de implementar a escala comercial y muy variables lo que no permitiría su estandarización. Sin embargo, los procesos de fermentación



tienen un periodo corto de tiempo, lo que permitiría, en caso de ser posible, reducir los niveles de Cd de forma rápida y relativamente económica. En este documento, se resumirán los principales hallazgos de experimentos de investigación realizados referente a la mitigación de Cd mediante técnicas de fermentación. Así también, se presentarán algunos resultados de la concentración de Cd en diferentes partes de las almendras de cacao encontradas en el proyecto. El objetivo de esta nota técnica es informar sobre las principales condiciones durante el proceso de fermentación y las reducciones o no de las concentraciones de Cd.



## 2. FLUCTUACIÓN DE CADMIO ENTRE LA CÁSCARA Y LA SEMILLA DE CACAO DURANTE EL PROCESO DE POSTCOSECHA

Cadmio es un elemento que existe de forma natural en todos los suelos del mundo en menor o mayor concentración (mg de Cd por kg de suelo, o ppm). En general, la concentración promedio de los suelos no contaminados es  $\sim 0.40 \text{ mg kg}^{-1}$  (Six & Smolders, 2014), pero algunos suelos pueden exceder fácilmente esta concentración y pueden ser considerados contaminados (Kabata-Pendias, 2010). Una vez en el suelo, este elemento es transferido a la planta y acumulado en partes comestibles (Zhao et al., 2023) lo que supone un riesgo al consumidor. Cadmio es un elemento sin función metabólica en los seres vivos por lo que su acumulación excesiva está ligada a problemas de salud graves como cáncer (Reeves & Chaney, 2008). Por esta razón, y como medida preventiva para precautelar la salud de consumidores, organizaciones de salud gubernamentales establecen normativas para regular las concentraciones de Cd en alimentos (European Commission, 2014). A partir del 2019, los países de la comunidad europea incluyeron el chocolate dentro de los productos regulados con una concentración máxima permitida de entre 0.10 a 0.80  $\text{mg kg}^{-1}$ .

Esta normativa motivó a generar información científica que permita entender la problemática y generar alternativas de mitigación en varios puntos de la cadena de producción y comercialización de cacao (Vanderschueren et al., 2021). El principal enfoque ha sido reducir la absorción de Cd en plantas de cacao, por medio de procesos biogeoquímicos que disminuyan la biodisponibilidad del elemento en el suelo (Argüello et al., 2023; Chavez et al., 2016; Quiroga-Mateus et al., 2022; Ramtahal et al., 2019). Dentro de los principales hallazgos se reporta que la reducción de Cd biodisponible es factible con el incremento de pH de suelos, esto se logra con la aplicación de carbonatos de calcio ( $\text{Ca}(\text{CO}_3)_2$ ) o materiales con alto contenido de cenizas (Argüello et al., 2020; López et al., 2022). Otros autores también recomiendan el uso de microorganismos, como bacterias tolerantes a Cd, pero esta alternativa requiere identificación, aislamiento y reproducción de microorganismos específicos (Quiroga-Mateus et al., 2022), lo que no es totalmente disponible en los países productores de cacao. A pesar de que estas alternativas son técnicamente viables, factores como costo de las enmiendas y el tiempo que tardan las alternativas en reducir las concentraciones de Cd en almendras (Argüello et al., 2023), son aspectos restrictivos para una implementación masiva de estas alternativas.

Otra opción para reducir los niveles de Cd en almendras de cacao peladas es la modificación del proceso de fermentación. Este tipo de alternativas ha sido investigado a menor escala que la agronómica pero los estudios han podido determinar factores fundamentales para la reducción de Cd en esta etapa de la cadena productiva. La fermentación es un proceso que promueve cambios bioquímicos, mediado por acción microbiana, y que busca resaltar propiedades organolépticas de la almendra de cacao, como sabor y aroma. Este proceso se lleva a cabo en etapas marcadas por el tipo de compuesto que domina el proceso como: azúcares y compuestos



de fácil degradación, etanol, y, ácidos lácticos y acéticos (figura 1). Durante estas etapas se producen cambios físico-químicos en la caja de fermentación, como el incremento de temperatura y fluctuaciones en el pH, que están interrelacionados con el tipo de compuesto producido. Estos cambios y su magnitud afectan la concentración de Cd en las almendras (de aquí en adelante, semillas) de cacao sin cáscara.

Las concentraciones de Cd en la semilla de cacao se reducen solo si se cumplen ciertas condiciones durante el proceso. Primero, una reducción de pH en la semilla  $< 5$ , idealmente 4.5 para que exista una removilización del metal. Segundo, una temperatura superior a  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  por al menos 24 horas. Estos dos factores deben de ocurrir de forma simultánea para que el efecto sobre la concentración del contaminante ocurra. Este cambio en la concentración de Cd se da entre el día 3 y 4 de la fermentación. Durante estos días, el Cd en la semilla se reduce hasta en un 50% con respecto al inicio de la fermentación, mientras que la concentración en la testa (cáscara) se incrementa tres veces.

Estos cambios en la concentración de Cd se dan bajo estas condiciones (pH y temperatura) debido a la molécula que hace la función de quelatar el metal. Como Cd no es un elemento necesario para la planta, y, muy probablemente ingresa utilizando un transportador metálico no específico (Vanderschueren et al., 2021), es inmovilizado por enzimas conocidas por asociar elementos metálicos similares a Cd como  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  (Vanderschueren et al., 2022). Esta enzima se conoce como fitasa o ácido fosfónico. Esta enzima se desdobra a un pH  $< 5$  y a temperaturas superiores a  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por lo que, si estas condiciones son alcanzadas durante la etapa de fermentación, el Cd quedará soluble y se movilizará al exterior de la semilla (Blommaert et al., 2023). Este cambio de Cd inmóvil a soluble está asociado al elemento que acompaña a Cd en la semilla. Antes del proceso de fermentación, Cd está asociado a azufre (Cd-S) mientras que luego de un proceso de fermentación con bajo pH y alta temperatura ( $> 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) el metal se asocia con oxígeno (Cd-O) que son bastante solubles.

Es posible la mitigación de Cd durante el proceso de fermentación. La reducción de Cd en la semilla de cacao puede llegar hasta 50% con respecto a la concentración inicial del elemento. Sin embargo, es necesario conocer que esta reducción está acompañada por condiciones de fermentación que pueden afectar características organolépticas deseadas, como color y sabor. Normalmente, el pH de la fermentación debería de ser  $> 6$  pero para que exista una reducción de Cd este pH no es suficiente por lo que se necesita incluir ácidos orgánicos como acético o láctico. Un aspecto positivo de la potencial mitigación de Cd durante esta etapa es la posibilidad de realizarlo de forma económica y a corto tiempo, esto comparado con alternativas agronómicas que toman un tiempo mucho más prolongado en mostrar cambios en la concentración de Cd en almendras. Para el escalamiento de esta tecnología aún es necesario tener más investigación, sobre todo en los efectos negativos del incremento en la temperatura y acidificación en sabor y color de cacao, sobre todo en mercados especiales.



### **3. OBJETIVOS**

#### *3.1 General*

El objetivo de esta investigación fue determinar el potencial de mitigación de Cd en almendras de cacao durante el proceso de fermentación usando referencias bibliográficas y experimentos de pequeña escala.

#### *3.2 Específicos*

- Realizar una búsqueda de literatura que permita identificar las características generales para la reducción de Cd en procesos de fermentación.
- Estudiar la distribución de los contenidos de Cd en testa y almendras peladas que permitan identificar posibles migraciones de Cd desde un tejido hacia el otro.
- Concluir sobre la factibilidad técnica de la mitigación de Cd en almendras de cacao durante la fase de postcosecha y futuros escenarios para la implementación de esta estrategia a gran escala.

### **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### *4.1 Cambios generales que ocurren durante la etapa de fermentación*

La fermentación de cacao es un proceso de varias etapas, inicialmente dominado por la conversión de glucosa y fructosa en etanol por medio de las levaduras. Posteriormente, este etanol es convertido en ácido acético y láctico por medio de bacterias productoras de ácido acético y láctico, respectivamente (figura 1). Durante este proceso, que tiene una duración de entre 5 y 7 días, existe un incremento de temperatura durante la etapa formación de etanol y una estabilización, hasta llegar a temperatura ambiente en la etapa de conversión de etanol a ácidos acéticos y lácticos.

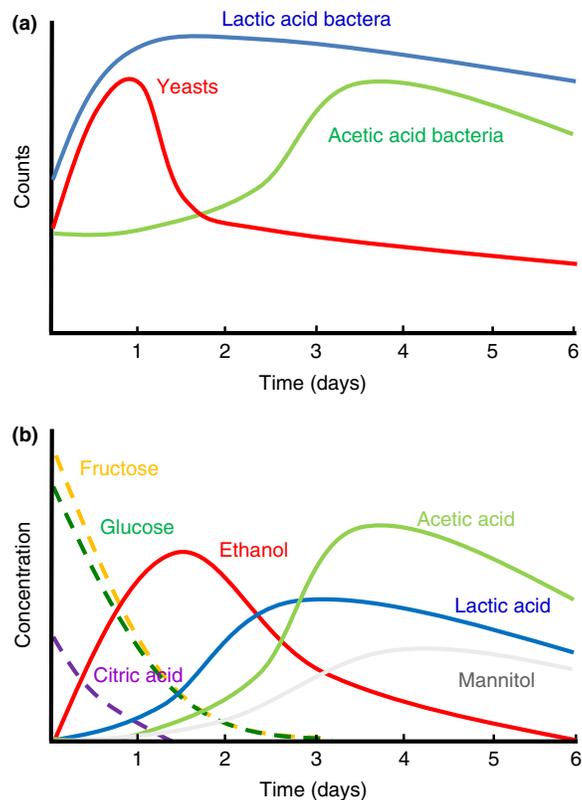


Figura 1. Microorganismos (a) involucrados y compuestos (b) sintetizados durante el proceso de fermentación de cacao. Tomado de De Vuyst & Weckx 2016

Por otro lado, la distribución de Cd sigue el siguiente patrón: testa > mazorca > semilla > placenta. Este patrón fue reportado por Vanderschueren et al., (2019) en un estudio realizado en Ecuador. Esta distribución fue parcialmente corroborada por este estudio. En un ensayo de fermentación llevado a cabo en el proyecto, se detectó que la mayor concentración está en la testa que es la cáscara protectora de la semilla y que se considera un subproducto en la producción de chocolate. Para esta nota técnica, nos enfocaremos en los cambios que ocurren entre la semilla de cacao y la testa ya que son los productos finales del proceso de fermentación. De acuerdo con los datos obtenidos en el proyecto, la concentración de Cd en testa es 188% ( $\pm$  48%) mayor que la de las almendras (figura 2). Es necesario precisar que la medida de concentración es mg de Cd por kg de masa seca de la matriz, entonces, corrigiendo por la masa de la testa, la diferencia de Cd entre cacao con y sin testa es menor a 15%. Esto debido a que la masa de la testa oscila entre los 7 y 10% de la masa total de la almendra, por lo que, remover la testa no afecta la concentración de Cd medida en la semilla.

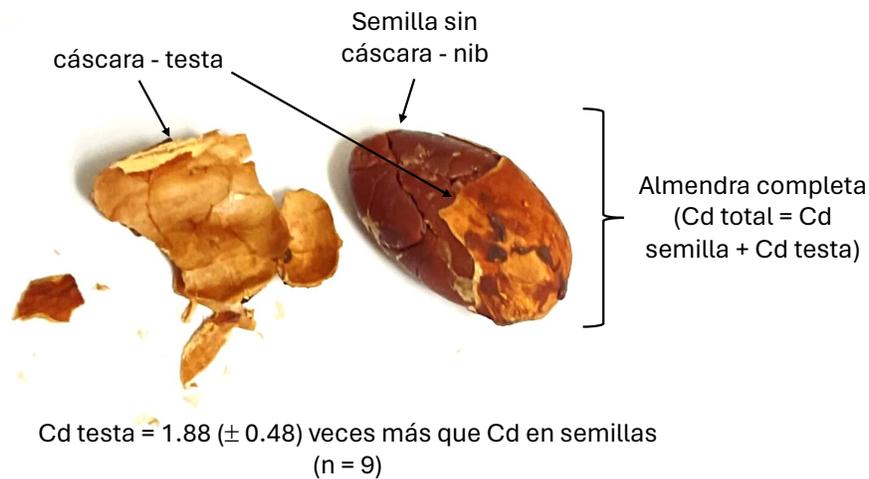


Figura 2. Componentes de la almendra de cacao y explicación de la distribución de cadmio (Cd) en los diferentes tejidos. Fuente: Los autores

Durante el proceso de fermentación, existen variaciones de pH y temperatura en los diferentes componentes de la masa de cacao dentro de la caja de fermentación. Estas variaciones afectan la concentración de Cd entre los tejidos de la semilla de cacao. En el primer estudio, reportado por Vanderschueren et al., (2019), indica que existe una reducción de 40% (aproximadamente) entre concentraciones de Cd en la semilla de cacao (nib) antes y después de la fermentación. En este estudio, los investigadores identificaron que esta reducción solo se da cuando el pH es inferior a 5 y la temperatura superior a 55 °C, por lo que, en este estudio se cumplieron estas condiciones en dos de las cuatro cajas de fermentaciones evaluadas. El cambio más notorio se dio en el día 4 (figura 3). El Cd que se reduce de la semilla es, aparentemente, secuestrado por la testa en un proceso de quelación (que se discutirá más adelante).

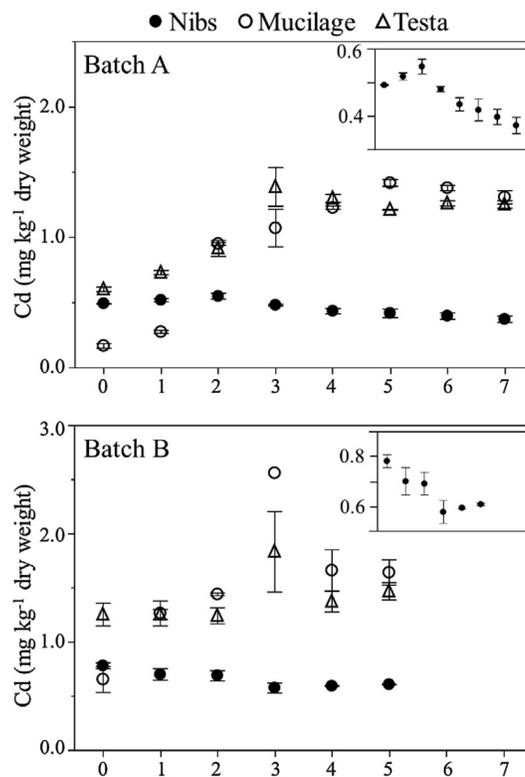


Figura 3. Dinámica de la concentración de cadmio (Cd) durante la etapa de fermentación en dos lotes de cacao comerciales. El cuadro superior de la derecha en ambos gráficos en una magnificación de la concentración de Cd en la semilla (tomado de Vanderschueren et al., 2019)

#### 4.2 Investigación en condiciones controladas

Los procesos de fermentación bajo condiciones de campo pueden ser afectados por condiciones ambientales como la temperatura, precipitaciones y microorganismos autóctonos (De Vuyst & Weckx, 2016), por lo tanto, son procesos muy variables que no permitirían entender los mecanismos complejos como el movimiento de Cd entre los diferentes tejidos. Por esta razón, la mayoría de las investigaciones se han realizado en condiciones controladas lo que puede considerarse poco realista. El objetivo de estos estudios era entender los procesos bioquímicos que afectan la distribución de Cd entre semillas (nibs) y testa.

Para entender el efecto de la acidificación en la distribución de Cd durante la etapa de fermentación, Vanderschueren et al., (2022) realizaron un experimento de laboratorio para alterar artificialmente el pH de la fermentación. Para decrecer el pH de la fermentación, los autores utilizaron ácidos producidos en la fermentación, como láctico y acético, producidos normalmente durante el proceso de fermentación (figura 1). Estos ácidos fueron adicionados en

diferentes etapas de la fermentación. La temperatura de fermentación incrementó, en todos los tratamientos sin efecto de los ácidos adicionados, hasta 45 °C. Esta temperatura se incrementó entre el día 4 y 5 de la fermentación. El pH de la semilla decreció de 5.2 a 4.4 o 4.5, para los tratamientos con ácido láctico y acético, respectivamente, comparados con el control. Este decrecimiento en pH logra que una proporción de Cd se vuelva móvil, comparado con el pH del control. La relación entre el Cd total y el Cd soluble en agua incrementa en un 50 % (cuando la semilla se acidifica) vs 20% antes de la fermentación. Este cambio se puede observar en la figura 4, usando la técnica de la ablación laser, los autores lograron plasmar la solubilidad de Cd en las semillas de cacao fermentadas comparadas con las no fermentadas. Esta solubilidad estaría relacionada a la movilidad de Cd entre la semilla y la testa. A pesar de estos hallazgos, los autores no pudieron determinar un efecto significativo de la concentración de Cd en la semilla y solo se encontró cambios significativos en la testa.

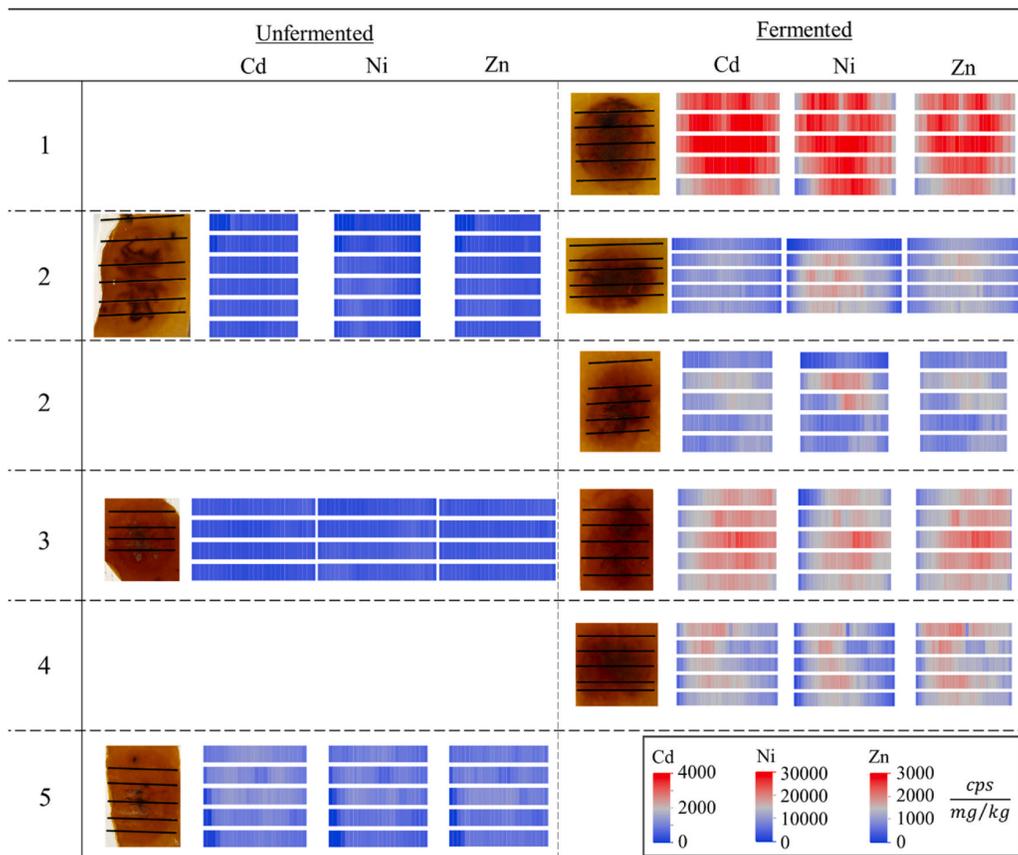


Figura 4. Imágenes de la concentración de cadmio (Cd), níquel (Ni) y zinc (Zn) soluble antes (izquierda) y después (derecha) del proceso de fermentación. Las imágenes fueron construidas con ablación laser. Tomado de Vanderschueren et al., 2022)



En un segundo experimento de laboratorio, Vanderschueren et al., (2023) incluyeron la acidificación de las condiciones de fermentación más un incremento artificial de la temperatura. Para la acidificación de la fermentación se utilizó solo ácido acético, mientras que, para el incremento de la temperatura se utilizó una estufa de convección. Las temperaturas probadas en este segundo experimento fueron 25 (ambiente), 45 (alcanzado en el experimento anterior de forma natural) y 65 °C. Esta última temperatura es extrema y no se observa de forma natural en las fermentaciones de forma espontánea (De Vuyst & Weckx, 2016). Existió una relación negativa ( $R^2 = 0.73$ ,  $p < 0.01$ ) entre Cd y el pH de la semilla sin cáscara. Esta relación es aumentada por efecto de la temperatura, es decir, en los tratamientos con  $T = 65$  °C, la concentración en la semilla fue 50% menor comparada con la concentración de la semilla a  $T = 25$  °C (figura 5).

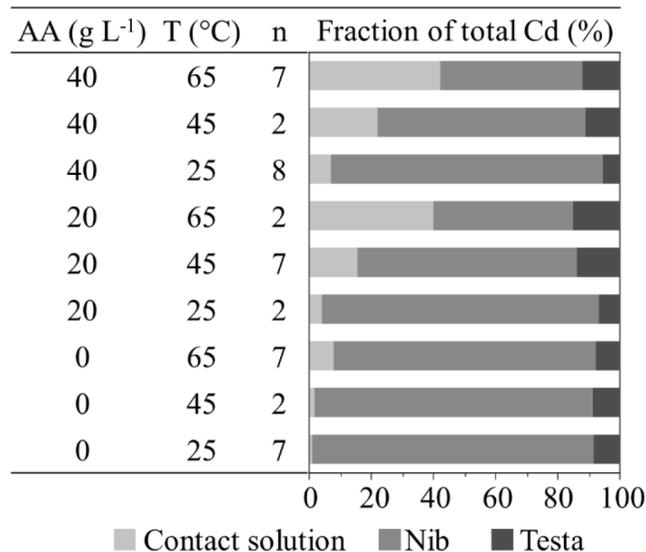


Figura 5. Distribución porcentual (%) de cadmio (Cd) soluble en función de Cd total en la almendra (nib) testa y mucílago (contact solution) durante el proceso de la fermentación. Tomada de Vanderschueren et al., (2023)

De esta última investigación se desprende uno de los hallazgos más relevantes respecto al efecto de los procesos de fermentación en la concentración de Cd. Los investigadores reportaron que la concentración de Cd está estrechamente ligada a las fitasas que son compuestos ricos en fósforo y que funcionarían como agentes quelatantes del contaminante en la almendra.

#### 4.3 Especiación de cadmio (Cd) en las almendras de cacao durante el proceso de fermentación

Como se explica en las secciones anteriores, los resultados de reducción de Cd en los procesos de fermentación no son constantes, más bien, son dependientes de factores como pH y temperatura. Ninguno de estos dos factores actúa de forma independiente, sino más bien, de



forma interactiva. Esto se observó en la investigación desarrollada por Vanderschueren et al., (2022) en donde la acidificación por sí sola no produjo cambios significativos en la concentración de Cd en la semilla sin cáscara.

La respuesta a estos resultados inconcluyentes es parcialmente respondida por Vanderschueren et al., (2023) y Blommaert et al., (2024). En ambos artículos, los autores indican que la concentración de Cd en la semilla está fuertemente asociada a la fitasa y que estos compuestos sirven como un quelatante natural de Cd y mecanismo de desintoxicación de la planta. La fitasa, conocido también como ácido fítico, es una enzima considerada como un compuesto antinutricional, que es producida por las plantas como un quelatante de iones como  $\text{PO}_3^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , y  $\text{Cd}^{2+}$ . Los elementos quelatados por la fitasa son inmovilizados fuertemente por lo que su biodisponibilidad se reduce de forma significativa. Esta es la razón por la que este compuesto es considerado antinutricional (Vashishth et al., 2023). Esta enzima es insoluble en el tracto digestivo por lo tanto está relacionada a la poca disponibilidad de fósforo, calcio, magnesio y zinc, principalmente (Arafsha et al., 2023). Esta enzima es fácilmente desdoblada bajo condiciones de ácidos ( $\text{pH} < 5$ ) y temperaturas  $> 55$  °C. Estas condiciones fueron aplicadas por Vanderschueren et al., (2023) obteniendo una reducción de cerca del 50% de Cd soluble en las semillas de cacao. En línea con este resultado, la concentración de fitasa en las almendras tuvo una relación lineal ( $R^2 = 0.56$ ,  $p < 0,01$ ) después de la incubación (figura 6).

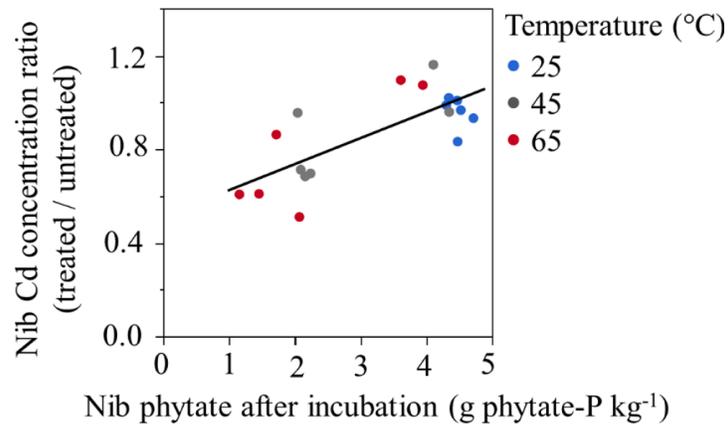


Figura 6. Concentración de fitasa después de la incubación y ratio de la concentración de Cd en Almendras tratadas y sin tratar con ácido acético para demostrar la influencia de fitasa en la movilización de Cd secuestrado en la enzima. Tomado de Vanderschueren et al., (2023)

Blommaert et al., (2024) analizaron la concentración de Cd y fitasa antes y después de tratar las semillas con ácido acético y temperatura. Los autores encontraron que, aplicando  $20 \text{ g L}^{-1}$  de ácido acético e incrementando la temperatura a  $65$  °C la concentración de fitasa se redujo de  $5.18$  a  $2.19 \text{ g P-fitasa kg}^{-1}$ . En este tratamiento la concentración de Cd en la semilla (sin cáscara) se redujo



de 9.03 a 6.09 mg kg<sup>-1</sup>. De igual manera la concentración de Cd en la testa (cáscara) se incrementó de 7.78 a 19.6 mg kg<sup>-1</sup> (Blommaert et al., 2023). Estos resultados son bastante concluyentes sobre la influencia de la fitasa en la solubilidad (o no) de Cd en la semilla. Adicional a la concentración de Cd total en semillas, la especiación del elemento cambio antes y después del proceso de fermentación. El Cd en la semilla de cacao estuvo asociado principalmente a azufre (S) o ligantes sulfúricos que son estables a condiciones ambientales. Una vez realizada la fermentación, que incluyó temperatura y adición de ácidos, el Cd en la semilla se ligó a oxígeno (O) que es una especie menos estable y por lo tanto más móvil. Estos hallazgos permiten identificar cambios a nivel bioquímico que afectan la potencial eficacia de la reducción de Cd en semillas durante la etapa de fermentación. Para romper el quelatante de Cd (fitasa) en la semilla es necesario alcanzar condiciones de acidez (pH < 5) y altas temperaturas (> 55 °C), estas condiciones romperían los enlaces químicos de la molécula liberando el Cd y moviéndolo hacia fuera de la semilla.



## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Cadmio es un elemento natural presente en los suelos agrícolas y acumulado en las plantas. Algunas plantas, como el cacao, acumulan el elemento en partes consumibles en concentraciones por encima de normativas sanitaria. Las regulaciones sanitarias limitan las concentraciones de Cd en los productos consumidos por la población. El objetivo de estas regulaciones es proteger la salud de los consumidores, sin embargo, pueden ser restrictivas para el comercio desde los países productores.

Las almendras de cacao de países de América Latina y el Caribe (ALC), utilizadas para la manufactura de chocolate de alta calidad, tienen una concentración de Cd mayor que las comercializadas desde África. Es urgente encontrar medidas para reducir la concentración de Cd en almendras de cacao y/o chocolate producido en ALC. Estas medidas deben de ser fácilmente aplicables y de bajo costo. Se han realizado investigaciones en campo con relativo éxito, sin embargo, la tecnología reportada como exitosa tiene alto costo y el tiempo de reacción de la estrategia es superior a los tres años por lo que su aplicación es limitada.

La reducción de Cd durante el proceso de fermentación es posible gracias a la lisis de una enzima encargada del secuestro de Cd en las almendras. Esta enzima es la fitasa que es el reservorio más abundante de P en la semilla y es encargada de secuestrar varios metales divalentes. El Cd asociado a la fitasa se vuelve disponible a altas temperaturas ( $> 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y bajo pH ( $< 5$ ) ya que a estas condiciones ocurre la lisis de fitasa. La mayoría de los estudios donde la reducción de Cd ha sido reportada en las semillas sin cáscara han sido implementados en laboratorio, con adiciones de ácido y temperaturas de forma exógena. Estas investigaciones han ayudado a entender el mecanismo de movilización de la semilla a la cáscara, sin embargo, no se ha logrado escalarlo a niveles comerciales. Otra limitante de estos hallazgos es que estas condiciones de fermentación podrían afectar la calidad organoléptica de cacao, que es una característica diferencial del cacao de ALC

Es necesario probar diferentes técnicas de fermentación con el objetivo de incrementar la temperatura de forma espontánea pero controlada. Estas fermentaciones deben explorar el uso de materiales que conserven el calor, de forma uniforme, a lo largo del proceso. Se podría incluir el uso de microorganismos iniciadores de la fermentación. Estos microorganismos podrían incluir grupos de bacterias ácido-lácticas para reducir, de forma natural, el pH de la fermentación. Alternativamente, se podría utilizar microorganismos que promuevan la lisis de la fitasa y así, de forma natural y sin afectar el pH y la temperatura, desdoblar esta enzima y liberar el Cd secuestrado en ella.

Estos trabajos deben de realizarse acompañados de técnicas de imágenes que permitan distinguir la distribución del elemento antes y después de los tratamientos.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arafsha, S. M., Aslam, M. F., Ellis, P. R., Latunde-Dada, G. O., & Sharp, P. A. (2023). Strategies to increase the bioaccessibility and bioavailability of iron and zinc from cereal products. In *Proceedings of the Nutrition Society*. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/S0029665123003543>
- Argüello, D., Chavez, E., Gutierrez, E., Pittomvils, M., Dekeyrel, J., Blommaert, H., & Smolders, E. (2023). Soil amendments to reduce cadmium in cacao (*Theobroma cacao* L.): A comprehensive field study in Ecuador. *Chemosphere*, 324, 138318. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138318>
- Argüello, D., Dekeyrel, J., Chavez, E., & Smolders, E. (2022). Gypsum application lowers cadmium uptake in cacao in soils with high cation exchange capacity only: A soil chemical analysis. *European Journal of Soil Science*, 73(2). <https://doi.org/10.1111/ejss.13230>
- Argüello, D., Montalvo, D., Blommaert, H., Chavez, E., & Smolders, E. (2020). Surface soil liming reduces cadmium uptake in cacao seedlings but subsurface uptake is enhanced. *Journal of Environmental Quality*, 49(5), 1359–1369. <https://doi.org/10.1002/jeq2.20123>
- Blommaert, H., Sarret, G., Eduardo, C., Smolders, E., & Vanderschueren, R. (2023). Cadmium speciation in cacao beans changes during a fermentation-like incubation. *Food Chemistry*, 398(August 2023). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137068>
- Campbell, P. G. C. (2006). Cadmium-A priority pollutant. *Environmental Chemistry*, 3(6), 387–388. <https://doi.org/10.1071/EN06075>
- Chavez, E., He, Z. L., Stoffella, P. J., Mylavarapu, R., Li, Y., & Baligar, V. C. (2016). Evaluation of soil amendments as a remediation alternative for cadmium-contaminated soils under cacao plantations. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(17). <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6931-7>
- De Vuyst, L., & Weckx, S. (2016). The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. In *Journal of Applied Microbiology* (Vol. 121, Issue 1, pp. 5–17). <https://doi.org/10.1111/jam.13045>
- EFSA. (2011). Scientific Opinion. Statement on tolerable weekly intake for cadmium. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), European Food Safety Authority (EFSA). *EFSA Journal*, 9(2), 1975. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.1975>.
- European Commission. (2014). *Commission regulation (EU) No 488/2014 of 12 May 2014 amending regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of cadmium in foodstuffs*. *Off. J. Eur. Union*. 9(488). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.1975>.
- Kabata-Pendias, A. (2010). *Trace Elements in Soils and Plants*. CRC Press, 4 edition.



- López, J. E., Arroyave, C., Aristizábal, A., Almeida, B., Builes, S., & Chavez, E. (2022). Reducing cadmium bioaccumulation in *Theobroma cacao* using biochar: basis for scaling-up to field. *Heliyon*, *8*(6). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09790>
- Quiroga-Mateus, R., López-Zuleta, S., Chávez, E., & Bravo, D. (2022). Cadmium-Tolerant Bacteria in Cacao Farms from Antioquia, Colombia: Isolation, Characterization and Potential Use to Mitigate Cadmium Contamination. *Processes*, *10*(8). <https://doi.org/10.3390/pr10081457>
- Ramtahal, G., Umaharan, P., Hanuman, A., Davis, C., & Ali, L. (2019). The effectiveness of soil amendments, biochar and lime, in mitigating cadmium bioaccumulation in *Theobroma cacao* L. In *Science of the Total Environment* (Vol. 693). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.369>
- Reeves, P. G., & Chaney, R. L. (2008). Bioavailability as an issue in risk assessment and management of food cadmium: A review. *Science of the Total Environment*, *398*(1–3), 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.03.009>
- Six, L., & Smolders, E. (2014). Future trends in soil cadmium concentration under current cadmium fluxes to European agricultural soils. *Science of the Total Environment*, *485–486*(1), 319–328. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.109>
- Vanderschueren, R., Argüello, D., Blommaert, H., Montalvo, D., Barraza, F., Maurice, L., Schreck, E., Schulin, R., Lewis, C., Luis, J., Umaharan, P., Chavez, E., Sarret, G., & Smolders, E. (2021). Mitigating the level of cadmium in cacao products : Reviewing the transfer of cadmium from soil to chocolate bar. *Science of the Total Environment*, *781*, 146779. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146779>
- Vanderschueren, R., De Mesmaeker, V., Mounicou, S., Isaure, M.-P., Doelsch, E., Montalvo, D., Delcour, J. A., Chavez, E., & Smolders, E. (2020). The impact of fermentation on the distribution of cadmium in cacao beans. *Food Research International*, *127*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108743>
- Vanderschueren, R., Doevenspeck, J., Helsen, F., Mounicou, S., Santner, J., Delcour, J. A., Chavez, E., & Smolders, E. (2022). Cadmium migration from nib to testa during cacao fermentation is driven by nib acidification. *Lwt*, *157*, 113077. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113077>
- Vashishth, A., Tehri, N., Tehri, P., Sharma, A., Sharma, A. K., & Kumar, V. (2023). Unraveling the potential of bacterial phytases for sustainable management of phosphorous. In *Biotechnology and Applied Biochemistry* (Vol. 70, Issue 5, pp. 1690–1706). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/bab.2466>
- Zhao, D., Wang, P., & Zhao, F. J. (2023). Dietary cadmium exposure, risks to human health and mitigation strategies. In *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* (Vol. 53, Issue 8, pp. 939–963). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/10643389.2022.2099192>

## INSTITUCIONES PARTICIPANTES



Secretaría Técnica Administrativa



Con el apoyo de:



[www.fontagro.org](http://www.fontagro.org)

Correo electrónico: [fontagro@fontagro.org](mailto:fontagro@fontagro.org)