

**Universidad de Los Andes**  
**Facultad de Ciencias**  
**Departamento de Química**  
**Laboratorio de Investigación de Análisis Químico Industrial y**  
**Agropecuaria (LIAQUIA)**  
**Laboratorio Espectroscopia Molecular (LEM)**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

**Determinación de cadmio en licor de cacao  
mediante espectroscopia de absorción  
atómica en horno de grafito**

Br Kristopher Londero Balza  
Tutor: Prof. Alexis Zambrano  
Co-Tutor: Prof. David Picón

## Índice

|                                                                            | Pág. |
|----------------------------------------------------------------------------|------|
| Introducción                                                               | 4    |
| Capítulo I. Marco teórico                                                  | 5    |
| Generalidades del cacao                                                    | 5    |
| Generalidades del licor de cacao                                           | 6    |
| Definición de licor de cacao                                               | 7    |
| Composición fisicoquímica                                                  | 7    |
| Metales pesados                                                            | 7    |
| Metales pesados como contaminantes                                         | 8    |
| Cadmio                                                                     | 9    |
| Fuentes de contaminación de cultivos por cadmio                            | 11   |
| Toxicidad del cadmio                                                       | 12   |
| Cadmio en cacao                                                            | 13   |
| Métodos de detección de cadmio en cacao                                    | 14   |
| Espectroscopia de absorción atómica con atomización electrotrémica (ETAAS) | 14   |
| Instrumentación                                                            | 14   |
| Fuente de radiación                                                        | 15   |
| Atomizadores electrotrémicos y horno de grafito                            | 16   |
| Monocromador                                                               | 19   |
| Detector                                                                   | 19   |
| Procesador                                                                 | 19   |
| Programa de calentamiento del ETAAS                                        | 19   |
| Secado                                                                     | 20   |
| Pirólisis                                                                  | 20   |
| Atomización                                                                | 21   |
| Limpieza de tubo de grafito                                                | 21   |
| Proceso de atomización en el horno de grafito                              | 21   |
| Reducción con grafito                                                      | 22   |
| Disociación del óxido                                                      | 22   |
| Disociación del haluro                                                     | 22   |
| Interferencias en ETAAS                                                    | 22   |
| Interferencias espectrales                                                 | 22   |
| Absorción de fondo                                                         | 23   |
| Incandescencia                                                             | 23   |
| Interferencias no espectrales                                              | 23   |
| Interferencias de volatilización del soluto                                | 24   |
| Interferencias de la fase de vapor                                         | 24   |
| Correctores de fondo                                                       | 24   |
| Corrector de lámpara de deuterio                                           | 25   |

|                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------|----|
| Corrector de Smith-Hieftje                                       | 25 |
| Efecto Zeeman                                                    | 26 |
| Modificadores químicos                                           | 27 |
| Medición de la señal en ETAAS                                    | 27 |
| Límite de detección                                              | 28 |
| Límite de cuantificación                                         | 29 |
| Precisión                                                        | 29 |
| Cantidad de muestra                                              | 29 |
| Comparación con otras técnicas espectroscópicas                  | 29 |
| Antecedentes determinación de cadmio                             | 30 |
| Capítulo II. Hipótesis                                           | 37 |
| Objetivos                                                        | 38 |
| Objetivo general                                                 | 38 |
| Objetivos específicos                                            | 38 |
| Capítulo III. Metodología                                        | 39 |
| Muestreo                                                         | 39 |
| Procedimiento para la preparación del licor de cacao             | 41 |
| Procedimiento para la extracción de grasa                        | 41 |
| Tratamiento de la muestra                                        | 41 |
| Parámetros a optimizar en la presente investigación              | 43 |
| Capítulo IV. Resultados y discusión de resultados                | 44 |
| Optimización del modificador de matriz                           | 44 |
| Optimización de la temperatura de pirólisis y atomización        | 46 |
| Curva de calibración                                             | 51 |
| Optimización de la metodología a utilizar                        | 52 |
| Estudios de interferencia                                        | 54 |
| Estudios de recuperación                                         | 55 |
| Figuras analíticas de mérito                                     | 56 |
| Análisis de muestras                                             | 56 |
| Distribución de cadmio en la matriz de cacao                     | 60 |
| Disponibilidad de cadmio en función de la temperatura de tostado | 63 |
| Conclusiones                                                     | 64 |
| Bibliografía                                                     | 65 |

## Introducción

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es uno de los principales frutos cultivados en el mundo, ya que de éste se derivan una variedad de subproductos como el chocolate, que tiene una gran demanda debido a su aporte de minerales como hierro, magnesio, zinc y fósforo; contiene hidratos de carbono y grasas, constituyéndolo fuente importante de energía para el ser humano, convirtiéndose así en un elemento importante dentro de la dieta. Sin embargo, actualmente el consumo de cacao y sus derivados ha sido cuestionado, debido al posible riesgo que representan metales como cadmio, plomo, mercurio, entre otros que pueden estar presentes como contaminantes en esta matriz.

De ese modo, surgió el interés por determinar la presencia de residuos de cadmio en los granos de cacao, debido a que el cadmio es uno de los metales pesados asociado a los problemas de contaminación de los sistemas agua, suelo y aire, ya que posee características que provocan efectos adversos en el medio ambiente y en la salud de los seres humanos. Este metal al ser absorbido por el organismo, interfiere en procesos enzimáticos causando patologías tales como trastornos renales, edema pulmonar, daño a huesos e hígado y cáncer de próstata. Es por esto que los grandes mercados importadores de este rubro están tomando medidas estrictas sobre la regulación del contenido de este metal en el cacao, como es el caso de la Unión Europea que en el reglamento N° 1881/2006 de la Comisión del 2006, en el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios, acordaron los límites de cadmio para productos de cacao y chocolate que entró en vigencia a partir del 1 de enero de 2019. De ahí, el interés de distintos países tanto importadores como exportadores de conocer la cantidad de cadmio en los granos de cacao con la finalidad de contar con datos de referencia que le permitan fijar una posición clara ante las regulaciones internacionales que podrían representar un riesgo para las exportaciones de cacao.

Esta investigación presenta una recopilación de información sobre las generalidades del cacao, así como también de los metales pesados específicamente el cadmio, su toxicidad, el ciclo en la naturaleza, la presencia de éste en la almendra de cacao y algunos métodos de detección que se han empleado en granos de dicha planta. Además, tiene como finalidad desarrollar una metodología precisa y exacta para determinar el cadmio presente en el cacao y sus sub-productos y a su vez monitorear la cantidad de este metal presente en muestras de cacao de diferentes orígenes.

## Capítulo I. Marco teórico

### Generalidades del Cacao

El cacao (*Theobroma cacao*. L) es un árbol, con flores que nacen directamente del tronco, perteneciente a la familia *Esterculiaceae* que en estado salvaje alcanza 8-10 m de altura, pero bajo cultivo se reduce a 4-5 m para facilitar la recolección. Su fruto es voluminoso y mide entre 15-20 cm de longitud y 10-12 cm de ancho, contiene de 20 a 40 semillas ovoides rodeadas por una pulpa blanca, rosada o café, de sabor ácido a dulce y aromática. El ciclo del árbol dura unos 30 años, la primera recolección se realiza a los 3-4 años, realizándose posteriormente dos recolecciones anuales en donde cada árbol puede producir 30-50 frutos (1-4 kg de semillas/año) afirma Bravo (2015).

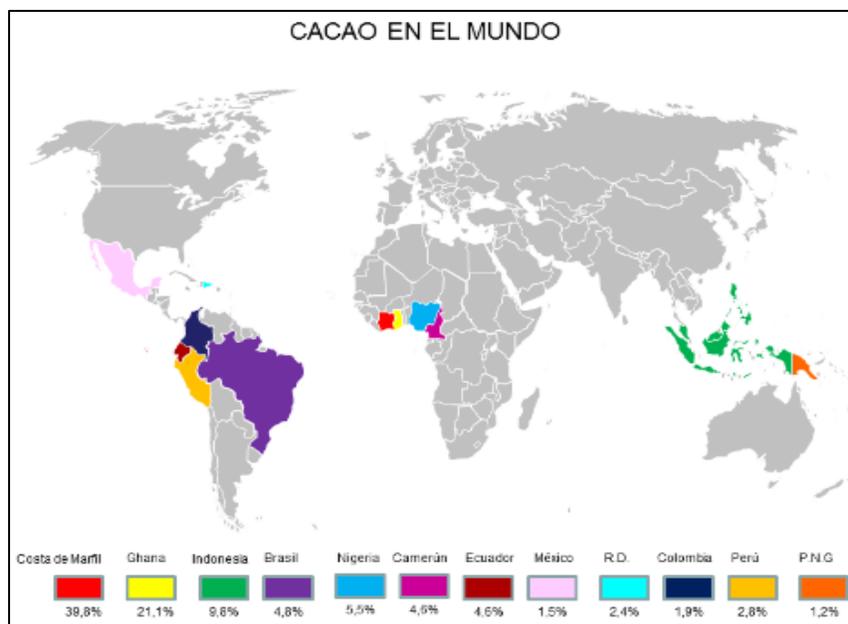
Según Anacafé (2004) las variedades de cacao son:

**Cacao Criollo:** se encuentra principalmente entre Venezuela y Colombia, existiendo el mayor número de variedades criollas en Venezuela como son: **Porcelana, Guasare, Pentágono, Criollo Andino, Ocumare, Chuao, etc.** Su proceso de fermentación es rápido, debido a que las moléculas de las células del cotiledón son más grandes y porosas, lo que permite la pérdida de compuestos químicos como polifenoles y purinas los cuales producen la astringencia y amargor del cacao. Del mismo modo, contienen más azúcar, compuesto vital para la fermentación. Su sabor amargo es usualmente bajo debido a la rápida fermentación. Los cacaos Criollos poseen más cafeína que teobromina, a diferencia de los Forasteros en los cuales sucede lo inverso. Sus hojas son ligeramente finas y suaves, sus semillas son usualmente grandes y abombadas. Las notas gustativas que dan estos cacaos, son principalmente a nuez, almendra, caramelo, madera y malta. Estos cacaos son sumamente costosos debido a su escasa producción y su alta calidad (Smulders *et al.*, 2008).

**Cacao Forastero o Amazónico:** generalmente tiene una astringencia y amargor alta. Las notas gustativas son a chocolate predominando el sabor a cacao (Smulders *et al.*, 2008).

**Cacao Trinitario:** proviene del cruce de cacao Criollo con Forastero. La calidad genética del cacao Trinitario dependerá de la carga genética de cacao Criollo al momento de la polinización. Las notas gustativas de estos cacaos son a frutas y notas florales (Smulders *et al.*, 2008).

El cacao es originario de América Central y Suramérica. Se ha introducido en diversas regiones de África y el sudeste asiático. África, es el continente que tiene una mayor producción, que llega a representar hasta el 69,68 % del total mundial, mientras que el 15 % se le atribuye al continente americano en donde Venezuela para el año 2015 obtuvo como producción unas 22.368 T, el continente asiático representa un 21 %, y tan solo un 1 % a Oceanía, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) (FAO/OMS, 2015). En la Figura 1 se muestran los principales países productores a nivel mundial de cacao.



**Figura 1. Producción mundial de cacao. Fuente Barón (2016).**

La Organización Internacional del Cacao (ICCO, 2012), señala que, los países europeos representan el 58 % de las importaciones netas de este fruto, seguido por Norte América (27 %), Asia (14 %) y África (1 %). Las importaciones procedentes de Latinoamérica y del sur-este de Asia son de importancia secundaria y terciaria, respectivamente desde el punto de vista de cantidad pero prioritaria en cuanto a lo que a calidad se refiere.

Lara (2017) expone como el cacao es un cultivo comercial no percedero muy valioso, que impulsa la economía de los países en desarrollo y es utilizado para la fabricación de chocolate y sus derivados. El cacao es considerado un alimento dado las características y propiedades fisicoquímicas que presenta. En la Tabla 1 se muestra la composición química del cacao en función de algunos elementos y compuestos en relación a su contenido.

**Tabla 1. Componentes en 100 g de cacao en base seca. Tomado de Naranjo (2011).**

| Bioelemento   | Contenido | Bioelemento     | Contenido    |
|---------------|-----------|-----------------|--------------|
| Calorías      | 456       | Fósforo         | 537 mg       |
| Agua          | 3,6 mL    | Calcio          | 106 mg       |
| Proteína      | 12 g      | Tiamina         | 0,17-0,24 mg |
| Grasa         | 46,3 g    | Riboflamina     | 0,14-0,41 mg |
| Carbohidratos | 34,7 g    | Niacina         | 1,7 mg       |
| Fibra         | 8,6 mg    | Ácido Ascórbico | 3 mg         |
| Glucosa       | 8-13 mg   | Piridina        | 0,9 mg       |
| Sacarosa      | 0,4-0,9 g | Hierro          | 3,6 mg       |

### Generalidades del licor de Cacao

#### Definición de licor de cacao

El cacao en pasta, masa o licor de cacao es el producto obtenido del cacao sin cáscara ni embrión, que se obtiene de vainas de cacao de calidad comerciable, que ha sido limpiado y

liberado de la cáscara, sin quitar ni añadir ninguno de sus elementos constituyentes, el cual es molido finamente y su contenido de agua residual es bajo (Codex Stan141, 2014). En la Tabla 2 se presentan las especificaciones técnicas del licor de cacao.

**Tabla 2. Especificaciones técnicas licor de cacao. Tomado de Meléndez (2017).**

| <b>Componentes</b>      | <b>Cantidad</b> |
|-------------------------|-----------------|
| Humedad                 | 2 % máximo      |
| pH                      | 5-6             |
| Grasa                   | 53 % mínimo     |
| Fineza (tamiz 200 mesh) | 99 % mínimo     |
| Ceniza                  | 5-6 %           |
| Contenido de cáscara    | 1,75 % máximo   |

### **Composición fisicoquímica**

La composición fisicoquímica de los granos de cacao y del licor depende de varios factores entre los que se puede citar: tipo de cacao, origen geográfico, grado de madurez, calidad de fermentación y secado, tal como se presenta en la Tabla 3 (Luna *et al.*, 2002).

**Tabla 3. Características fisicoquímicas del grano y licor de cacao. Tomado de (Luna *et al.*, 2002)**

| <b>Variables</b>    | <b>Grano</b> | <b>Licor</b> |
|---------------------|--------------|--------------|
| pH                  | 5,91         | 5,39         |
| Grasa (%)           | 48,58        | 54,24        |
| Cenizas totales (%) | 3,27         | 3,37         |
| Sólidos totales     | 42,92        | 46,16        |
| Fibra cruda (%)     | 4,30         | 3,67         |
| Proteína (%)        | 12,25        | 13,07        |
| Humedad (%)         | 8,5          | 1,67         |

En cuanto a toxicidad o contaminantes se refiere, Chaverrias (2012) dice que el chocolate es un alimento que apenas se relaciona con intoxicaciones alimentarias. Sin embargo, aunque son pocos los casos en los que, de forma directa, provoca problemas tras su ingesta, no está exento de riesgos. El autor explica que estos problemas están asociados con la presencia de metales pesados y plaguicidas. En el primer caso, destaca sobre todo el cadmio, el más habitual en el cultivo de cacao, ya que en su mayoría, se asocia al contenido natural del suelo, aunque los niveles detectados no representan riesgos sanitarios, despierta gran desconfianza en los mercados, sobre todo en el consumidor europeo, donde la legislación alimentaria es muy exigente, por tal motivo la Comisión Europea propone niveles de cadmio más elevados para el chocolate negro (con más cacao) y niveles más bajos para el chocolate con leche.

### **Metales pesados**

En la actualidad no existe una definición aceptada, por lo que diversos autores han propuesto una definición de este término, así pues:

Moreno (2017) define los metales pesados como un grupo de elementos no muy definidos que exhiben propiedades metálicas. Se incluyen principalmente metales de transición algunos semimetales, lantánidos y actínidos. También se han propuesto definiciones con base a la densidad, número atómico, peso atómico y algunas con base en sus propiedades químicas o de toxicidad según Duffus (2002).

El término de metal pesado se refiere a cualquier elemento químico metálico que tenga una alta densidad y/o peso, sea tóxico en concentraciones incluso muy bajas explica Lucho *et al* (2005).

Según Cárdenas (2012), los metales pesados son los que tienen densidad igual o superior a  $5 \text{ g/cm}^3$  siendo de mayor peso que los minerales formadores de roca en su forma elemental. Además, su número atómico es superior a 20 una, excluyendo los metales alcalinos y alcalino-térreos. Sin embargo, algunos autores, entre ellos Ward (1995) consideran esta definición un tanto ambigua y prefieren utilizar la definición de metales traza donde se engloban a todos los elementos presentes en concentraciones no detectables mediante técnicas de análisis clásicas, de forma que se considera elemento traza a los elementos detectables en un rango de concentración de 100 a 0,01 mg/kg y se reserva el término ultratrazas a niveles comprendidos entre 0,01 y 0,001 mg/kg.

Dentro de los metales pesados se distinguen dos grupos:

- **Oligoelementos:** Son elementos necesarios para el desarrollo de determinados organismos, son requeridos en pequeñas cantidades o cantidades traza y pasado cierto umbral se pasan a ser tóxicos. Dentro de este grupo se encuentran: arsénico (As), boro (B), cobalto (Co), cromo (Cr), cobre (Cu), molibdeno (Mo), manganeso (Mn), níquel (Ni), selenio (Se) y zinc (Zn).

- **Metales pesados sin función biológica conocida:** Metales cuya presencia en determinadas cantidades en los seres vivos, provocan disfunciones en sus organismos, resultan altamente tóxicos incluso en concentraciones muy pequeñas y presentan la propiedad de bioacumularse en los organismos, así como de asociarse a la contaminación ambiental. Entre los principales se tienen: cadmio (Cd), mercurio (Hg), plomo (Pb), cobre (Cu), níquel (Ni), antimonio (Sb), bismuto (Bi).

Estos metales se encuentran generalmente como componentes naturales de la corteza terrestre, en forma de minerales, sales u otros compuestos. No pueden ser degradados o destruidos fácilmente de forma natural o biológica ya que no tienen funciones metabólicas específicas para los seres vivos por lo que se han convertido en un tema actual como en el campo ambiental y en la salud pública, asegura Vázquez *et al* (2006).

### **Metales pesados como contaminantes**

La contaminación por metales pesados es uno de los problemas ambientales más serios en la actualidad. Industrias como la minería, la fundición de metales, la producción de combustible y energía a partir del petróleo, la industria de fertilizantes y pesticidas y sus aplicaciones, la industria del cuero, la industria fotográfica, la producción de energía atómica, entre otras, producen residuos que contienen metales pesados y estos terminan transfiriéndose al medio ambiente debido a un incorrecto tratamiento o disposición final.

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 según Angelova *et al* (2004). Para Wang y Chen (2009) los metales pesados pueden ser acumulados en los distintos eslabones de la cadena trófica (bioacumulación), e incluso trasladados a sitios muy alejados del punto de origen de la contaminación, usualmente a través de curso de agua (biomagnificación) por lo cual estos procesos traen consecuencias ambientales graves para el ecosistema y el hombre.

Moreno (2017) explica que la peligrosidad de estos elementos es aún mayor al no ser ni química ni biológicamente degradables. Actualmente, se conoce más sobre los efectos adversos de estos metales tanto en la salud humana (toxicología) como en los animales y plantas (ecotoxicología). Los efectos de esto sobre el funcionamiento de los ecosistemas varían considerablemente, son de importancia económica y de salud pública. Entre los mecanismos moleculares que determinan la toxicidad de los metales pesados se encuentra, el desplazamiento de iones metálicos esenciales y bloqueo de sus grupos funcionales, la modificación de la conformación activa de biomoléculas, enzimas, así, como la alteración de otros agentes biológicamente activos.

Para evaluar el grado de toxicidad de un metal pesado en el medio ambiente se deben considerar diversos factores, algunos de los más relevantes son la propia naturaleza del metal, las diversas fuentes que los introducen en el medio ambiente y su biodisponibilidad que depende de la forma física y química en que se encuentra en el medio, la capacidad de los organismos para absorberlo o ingerirlo. Estos elementos pueden ser acumulados en el organismo hasta tres, cuatro o cinco órdenes de magnitud mayores que la concentración del medio en donde se encuentran, lo que conlleva a alteraciones fisiológicas que se pueden evidenciar en el crecimiento y reproducción de las plantas e incluso puede conducir a la muerte afirman Ruiz y Armienta (2012).

La absorción de metales pesados por las plantas es generalmente el primer paso para la entrada de éstos 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. En plantas, el concepto de bioacumulación se refiere a la agregación de contaminantes; algunos de ellos son más susceptibles a ser fitodisponibles que otros (Kabata-Pendias, 2000).

La EPA (US Environmental Protection Agency) incluye en la lista de contaminantes prioritarios los siguientes 13 elementos: As, Sb, Be, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Ag, Pb, Se, Tl, Zn, que vienen de fuentes naturales tales como piedras y minerales metálicos. Entre los aportes antropogénicos de este metal se encuentra la metalurgia, la agricultura, la producción de energía, la minería, lodos residuales y eliminación de residuos Angelova *et al* (2004).

### **Cadmio**

En 1817 el químico y farmacéutico alemán Fridrix Stromeyer descubre el elemento número 48 al analizar algunos medicamentos a base de zinc. Es un elemento metálico que fue llamado cadmio por su descubridor, del vocablo griego cadmeia, con que se denominaban a las menas y óxido de zinc. Este elemento pertenece al Grupo IIB de la Tabla Periódica, con

peso atómico de 112,411 g/mol y densidad de 8,65 g/cm<sup>3</sup> y características muy parecidas a las del Zn y el Hg. El cadmio sólido es de color blanco, maleable y está constituido por cristales hexagonales.

Según Ramírez (2002) el Cd es un elemento que se encuentra en la naturaleza asociado a muchos minerales entre los cuales generalmente se encuentra unido al zinc. Su número de valencia es 2. La solubilidad de las sales de Cd en agua es muy variable, ya que los halógenos, el sulfato y el nitrato son relativamente solubles mientras que el óxido, el hidróxido son prácticamente insolubles en agua. En la Tabla 4 se muestran las propiedades fisicoquímicas de este metal.

**Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas del Cd. Tomado de Ramírez (2002).**

| <b>Propiedades fisicoquímicas</b>          | <b>Valores</b>         |
|--------------------------------------------|------------------------|
| Símbolo químico                            | Cd                     |
| Número atómico                             | 48                     |
| Grupo                                      | 12                     |
| Periodo                                    | 5                      |
| Estado                                     | Sólido                 |
| Estructura cristalina                      | Hexagonal              |
| Aspecto                                    | Plateado gris metálico |
| Bloque                                     | D                      |
| Densidad                                   | 8,650 g/mL             |
| Masa atómica                               | 112,411 uma            |
| Radio medio                                | 155 pm                 |
| Radio atómico                              | 158 pm                 |
| Estados de oxidación                       | 2                      |
| Punto de fusión                            | 320,9 °C               |
| Punto de ebullición                        | 765 °C                 |
| Electronegatividad                         | 1,69                   |
| Longitud de onda en espectroscopia atómica | 228,8 nm               |

Este metal se encuentra en la naturaleza de las siguientes formas:

- **Cd orgánico:** debido a la elevada estabilidad del enlace C-Cd bajo las condiciones ambientales como pH y potencial redox, el Cd se encuentra presente en numerosos compuestos de carácter orgánico.
- **Cd inorgánico:** se presenta en forma natural en rocas sedimentarias, rocas volcánicas y en aguas geotermales. En la naturaleza se presenta libre en pocas proporciones y también combinado con diversas sustancias: oxígeno (óxido de cadmio (CdO)), cloro (cloruro de cadmio (CdCl<sub>2</sub>)), o azufre (sulfato de cadmio (CdSO<sub>4</sub>), sulfuro de cadmio (CdS) según ATSDR (2012).

Es importante destacar que el hombre ha liberado Cd al ambiente sin saberlo desde que estuvo capacitado para fundir y refinar metales como zinc, plomo y cobre. En la actualidad, se le considera como uno de los elementos más tóxicos y por esto, es uno de los más estudiados. Tiene una vida media larga y se acumula en los seres vivos permanentemente,

por lo que ha ocasionado intoxicaciones masivas de seres humanos entrando a la cadena trófica por medio del suelo y a su vez a los cultivos (González, 2010 y ATSDR, 2012).

### **Fuentes de contaminación de cultivos por Cd**

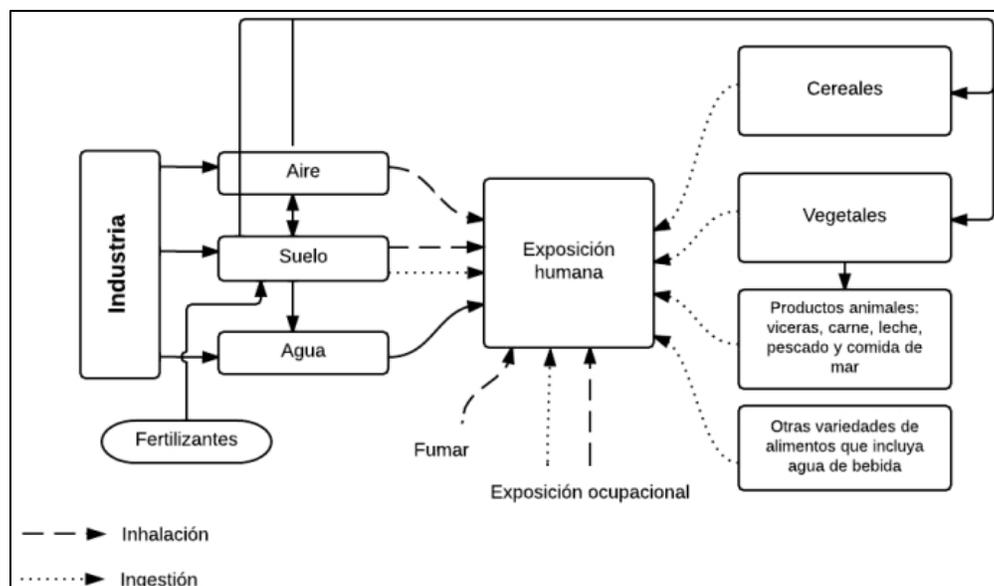
El cadmio llega a los cultivos por diferentes vías como:

- **Suelo:** González (2010) explica que el Cd en el suelo puede derivarse de fuentes naturales y antropogénicas. La contaminación atmosférica y la aplicación de fertilizantes parecen ser las principales fuentes antropogénicas de este elemento en los suelos utilizados para la agricultura, también actividades como la minería, la fundición, la quema de carbón, la irrigación de aguas contaminadas, residuos orgánicos, abonos de origen animal, plaguicidas y herbicidas, pueden aportar Cd al suelo, desde donde se movilizaría hacia las diferentes partes de las plantas y a su vez a los frutos de las mismas.

- **Agua:** puede presentar concentraciones variables de Cd que se producen de manera natural, aunque la contaminación por Cd en el agua también puede deberse a procesos industriales, tales como los implicados en la refinación de metales. La mayoría de las aguas en el mundo tienen concentraciones naturales de Cd inferiores a 0,01 µg/L, según valores de referencia de la OMS, sin embargo, este valor está limitado por la capacidad analítica de los métodos de determinación actuales. Se ha establecido que la exposición humana a niveles elevados de Cd inorgánico se produce principalmente por el consumo de aguas subterráneas que contienen niveles naturalmente altos (superiores a 0,05 µg/L) y el consumo de alimentos irrigados con agua contaminada o preparados con ésta afirman Acosta y Montilla (2011).

- **Fertilizantes:** la concentración de Cd en los fertilizantes depende de la concentración inicial que puedan contener las materias primas usadas en su producción. Por ejemplo: la roca fosfórica, usada para la elaboración de fertilizantes y detergentes puede llegar a contener entre 200 a 400 mg de Cd/kg Cantera *et al.* (2008).

En la Figura 2, se observa las fuentes de exposición humana a Cd, en donde se evidencia que la principal causa de contaminación proviene de las industrias aumentando los niveles de Cd en el suelo, agua y aire, de esta forma este metal es absorbido por las plantas y animales presentando un riesgo a los consumidores de estos alimentos. También se observa que la exposición a este metal se presenta por el consumo de cigarrillo y exposición ocupacional en trabajadores que están en contacto con derivados y/o subproductos de este elemento.



**Figura 2. Fuentes de exposición humana a Cd. Tomado de INVIMA (2016).**

### Toxicidad del cadmio

Si el suelo posee este metal fuera de los límites permisibles, es muy probable que el rubro cultivado allí, absorba Cd en concentraciones tales que puedan ocasionar problemas a la salud. Según la ASTDR (2012), el ingerir alimentos o tomar agua con niveles de cadmio muy altos produce irritación grave al estómago, generando vómitos y diarrea y en ciertas ocasiones la muerte. La ingestión de niveles o concentraciones bajas de cadmio, durante período prolongado de tiempo, puede producir acumulación en los riñones, y si se alcanza niveles altos por acumulación, se producirá daño al mismo. La exposición a niveles de cadmio durante un período prolongado genera alteraciones en la mineralización en los huesos (EFSA, European Food Safety Authority, 2009).

Wyszkowska *et al.* (2013) argumentan que el cadmio, tiene efectos agudos y crónicos sobre la salud y el ambiente, puesto que una vez liberado, no se degrada en la naturaleza. Aunque no es esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas, se toma fácilmente por el sistema de raíces, puesto que geoquímicamente es muy móvil en el suelo y agua (Ćurguz *et al.*, 2012).

Este metal al ser absorbido por el organismo, interfiere en procesos enzimáticos causando patologías tales como trastornos renales, edema pulmonar, daño a huesos e hígado y cáncer de próstata explican Santamaría *et al.* (2001), en particular, el óxido de cadmio está clasificado como una sustancia carcinogénica, mutagénica o tóxica para la reproducción, según la Unión Europea (UE, 2002).

Aunque la absorción del Cd en humanos es relativamente baja (3-5 %), éste es retenido en los riñones, en donde su toxicidad está asociada a su acumulación, especialmente, en las células tubulares proximales con posibles consecuencias de disfunción renal y posterior desmineralización ósea. En este contexto, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha clasificado el Cd como un cancerígeno humano (Grupo 1) sobre la base de estudios ocupacionales. De ese modo, los nuevos datos sobre la exposición humana al

Cd en la población general han sido estadísticamente asociados con un mayor riesgo de cáncer de pulmón, endometrio, vejiga y mama según European Food Safety Authority (EFSA, 2011).

### **Cadmio en cacao**

Para la FAO/OMS (2015) las consecuencias de la contaminación provocada por el cadmio en productos derivados del cacao como el chocolate, es un tema de interés comercial que impacta a la economía de los países productores. Como se explicó anteriormente, la contaminación del cultivo de cacao con Cd puede presentarse a través del suelo, el agua utilizada durante el cultivo, los plaguicidas residuales (cuya formación incluye derivados del Cd) y factores especiales asociados a otras actividades antropogénicas como ya se ha mencionado. De este modo, el cacao es uno de los cultivos más susceptibles a contaminarse por Cd, ya que su comportamiento químico es similar al de elementos esenciales como Zn y Cu que son absorbidos por la planta para sus procesos metabólicos. Las plantas expuestas a altos niveles de Cd presentan reducción en la fotosíntesis, la absorción de agua y nutrientes, como consecuencia, se observa, clorosis, inhibición del crecimiento, pardeamiento de las puntas de las raíces y finalmente, la muerte.

La preocupación sobre la contaminación de Cd en el cacao y productos de cacao alcanzó dimensiones internacionales, varios países exportadores e importadores realizaron diferentes estudios a fin de determinar la presencia de este y otros metales en esos productos.

El comité la comisión del Codex Alimentarius acordó iniciar un nuevo trabajo sobre el establecimiento de niveles máximos (NM) para el Cd en el chocolate y los productos derivados de cacao descritos en la Tabla 5, ya que sintetiza los diferentes estudios realizados por varios países y organismos internacionales sobre el contenido de Cd, así como la exposición en la dieta del ser humano, según FAO/OMS (2015).

**Tabla 5. Niveles máximos de cadmio en el chocolate y productos derivados de cacao para la FAO/OMS (2015).**

| <b>Producto</b>                                                                                                                             | <b>mg/kg</b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Chocolate con leche con un contenido de materia seca total de cacao < 30 %                                                                  | 0,20         |
| Chocolate con un contenido de materia seca total de cacao <50 %; chocolate con leche con un contenido de materia seca total de cacao ≥ 30 % | 0,60         |
| Chocolate con un contenido de materia seca total de cacao ≥ 50 %                                                                            | 1,5          |

Europa por ser uno de los principales importadores de cacao en el mundo ha llevado a discutir la implementación de límites de contenido de Cd en los productos de cacao y sus derivados importados, por lo que en el reglamento No. 488/2014, se establecieron los límites permisibles de Cd, que entró en vigencia a partir del 1 de enero de 2019 (Tabla 6).

**Tabla 6. Límites de cadmio para productos de cacao y chocolate para la UE**

| <b>Producto</b>                                                                                                                               | <b>mg/kg</b> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Chocolate con leche con un contenido de materia seca total de cacao < 30 %                                                                    | 0,10         |
| Chocolate con un contenido de materia seca total de cacao < 50 % ≥ 30 %                                                                       | 0,30         |
| Chocolate con un contenido de materia seca total de cacao ≥ 50 %                                                                              | 0,80         |
| Cacao en polvo vendido al consumidor final o como ingrediente en cacao en polvo edulcorado vendido al consumidor final (chocolate para beber) | 0,60         |

En Venezuela, la norma COVENIN (Comisión Venezolana de Normas Industriales) establece límites máximos de algunos elementos metálicos en los productos derivados del cacao (polvo y licor de cacao); por lo que se reportan límites máximos permitidos de metales en el grano de cacao para ser considerados como aptos para el consumo humano. En el caso del Cd la concentración máxima permitida es 0,30 mg/kg (COVENIN 50:2018 1<sup>era</sup> revisión).

#### **Métodos de detección de cadmio en cacao**

Existen diversas metodologías para la determinación de metales en alimentos, en su mayoría basadas en técnicas electroquímicas y espectroscópicas, tales como: Espectroscopia de Absorción Atómica con Vapor Frío (CVAAS), Espectroscopia de Absorción Atómica con Atomización Electrotérmica (ETAAS), Espectroscopia de Absorción Atómica de Llama (FAAS), Espectroscopia de emisión atómica con plasma acoplado por inducción (ICP-AES), Espectroscopia de Absorción Atómica con Descomposición Térmica – Amalgamación (TDA-AAS).

En este trabajo el análisis de muestras de licor de cacao para cuantificar cadmio, se llevará a cabo por medio de la técnica de Espectroscopia de Absorción Atómica con Atomización Electrotérmica (ETAAS).

#### **Espectroscopia de absorción atómica con atomización electrotérmica**

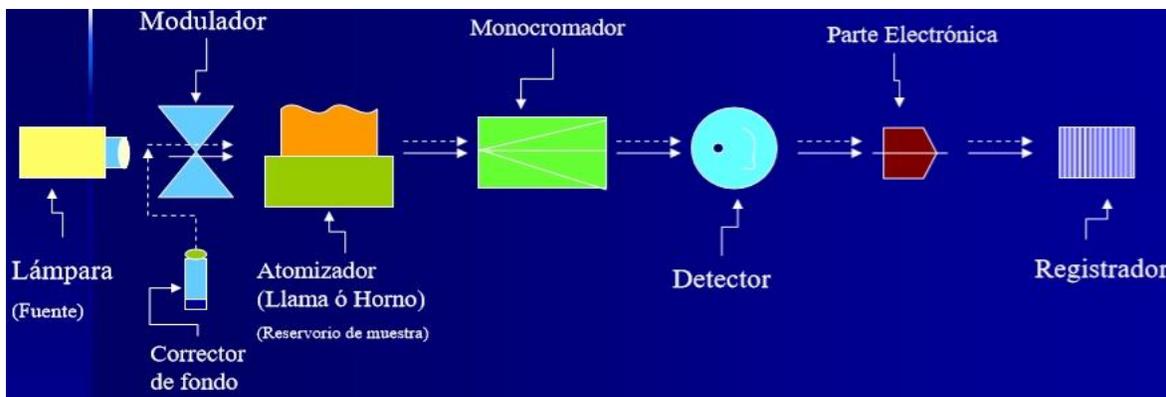
Esta técnica parte del mismo fundamento de cualquiera de las técnicas de absorción atómica, se hace incidir un haz de luz de longitud de onda adecuada sobre la muestra atomizada, en la cual la cual los tomos del analito absorben dicha radiación. La absorción de luz por parte del analito cumple con la Ley de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon b C \quad (1)$$

donde, **A** es la absorbancia,  $\epsilon$  es una constante de proporcionalidad denominada coeficiente de extinción molar, o absortividad molar, **b** es el ancho del camino óptico y **C** es la concentración del analito. Por lo cual se puede relacionar la concentración y la absorbancia ya que la absorbancia es proporcional a la concentración del analito).

#### **Instrumentación**

La instrumentación para esta técnica consiste en un espectrómetro de absorción atómica convencional equipado con un atomizador electrotérmico, en nuestro caso un horno de grafito. En la Figura 3 se presenta un esquema de los componentes básicos de un equipo de ETAAS:

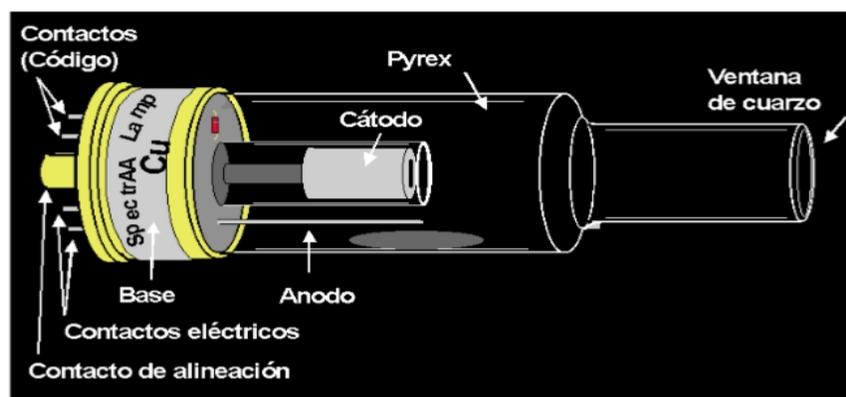


**Figura 3. Diagrama de bloque de espectrofotómetro de absorción atómica.** Fuente <https://huberthalcantara.wordpress.com/2012/03/16/partes-del-equipo-de-absorcion-atmicasystem-parts-diagram/>

Los componentes del espectrómetro de absorción atómica con atomización electrotérmica se describen a continuación:

### Fuente de radiación

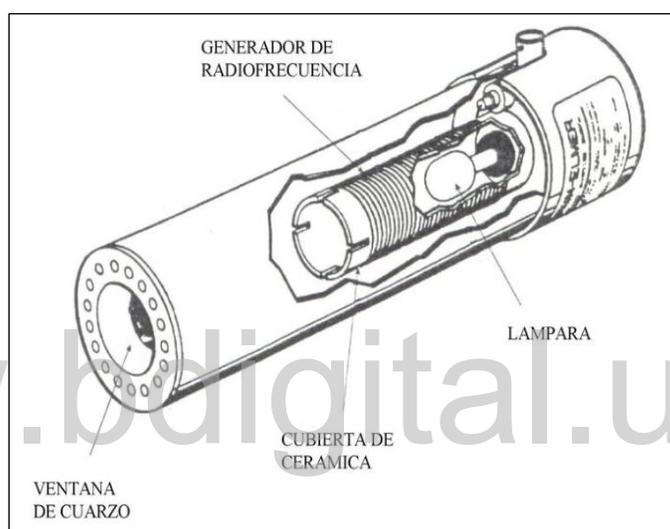
La técnica de absorción atómica mide la cantidad de luz que absorbe un analito, como requisito indispensable la fuente debe emitir longitudes de onda que el analito pueda absorber. Las fuentes que se utilizan para la espectroscopia de absorción atómica son las lámparas de cátodo hueco (LCH). Estas lámparas consisten en un cilindro de vidrio con una ventana de cuarzo (transparente a la radiación UV) dentro del cual hay un cilindro hueco construido del mismo elemento que el analito (calcio, hierro, plomo, cadmio, entre otros) el cual es el cátodo, un ánodo y un gas amortiguador (normalmente un gas noble). Al aplicar un gran voltaje entre el ánodo y el cátodo, el gas presente es ionizado dando lugar a un plasma. Los iones son entonces acelerados hacia el cátodo y logran desprender átomos de éste. Dichos átomos excitados, al relajarse emiten el espectro de líneas característico del elemento del que está construido el cátodo de la lámpara (Skoog, 2001). En la Figura 4 se presenta un esquema de una lámpara LCH.



**Figura 4. Esquema de lámpara de cátodo hueco.**

Fuente <http://blog.utp.edu.co/docenciaedwin/files/2014/03/FUENTES-DE-RADIACION>

Otro tipo de fuentes utilizadas son las lámparas de descarga sin electrodos (EDL), las cuales son fuentes de espectros atómicos de líneas muy utilizadas que generalmente, producen intensidades radiantes de uno o dos órdenes de magnitud superiores a las lámparas de cátodo hueco. Una lámpara típica está constituida por un tubo de cuarzo herméticamente cerrado que contiene un gas inerte, como el argón, a unos pocos torr (1-5) y una pequeña cantidad del metal (o su sal) cuyo espectro se desea obtener. La lámpara no contiene electrodos, pero, en su lugar, para su activación se utiliza un campo intenso de radiofrecuencia o radiación de microondas. De esta forma, se produce la ionización del argón, originándose iones que son acelerados por la componente de radiofrecuencia del campo hasta que adquieren la suficiente energía para excitar los átomos del metal cuyo espectro se desea. Existen lámparas de descarga sin electrodos comercializadas para 15 o más elementos. En la Figura 5 se muestra un esquema de una lámpara EDL.



**Figura 5. Esquema de lámpara descarga sin electrodos. Fuente <http://blog.utp.edu.co/docenciaedwin/files/2014/03/FUENTES-DE-RADIACION>.**

#### **Atomizadores electrotérmicos y horno de grafito**

El atomizador es la parte del equipo en el cual se lleva a cabo el proceso de atomización, es decir, es donde el analito es llevado al estado gaseoso en forma de átomos libres. Los atomizadores electrotérmicos logran atomizar la muestra por medio de altas temperaturas las cuales son generadas por calentamiento óhmico o por algún otro fenómeno eléctrico como por ejemplo arcos eléctricos.

Como se mencionó anteriormente, la ETAAS es una técnica analítica cuantitativa en la que se determina la absorbancia de una muestra a una longitud de onda específica. Dicha longitud de onda, corresponde a una línea de absorción del elemento que se analiza, y a su vez a una transición electrónica del estado fundamental hasta un estado excitado. La muestra debe ser atomizada en fase gaseosa para que se maximice la cantidad de átomos que puedan absorber la luz, para ello, es necesario alcanzar temperaturas muy altas las cuales dependerán del elemento a analizar. La atomización electrotérmica se puede llevar a cabo por medio de hornos de crisol vertical, equipos de filamentos abiertos y hornos de grafito, siendo el más utilizado este último.

El horno de grafito es el atomizador electrotrémico por excelencia. Se dice que es un atomizador electrotrémico, ya que la atomización se lleva a cabo por medio de calor generado por el flujo de corriente eléctrica a través de un tubo de grafito dentro del cual se coloca la muestra. Este tipo de calentamiento se denomina calentamiento óhmico ya que se origina por la resistencia que presenta el conductor (el grafito) al flujo eléctrico, con este tipo de calentamiento se puede alcanzar hasta los 3300 K, lo cual normalmente es suficiente para atomizar casi cualquier analito (Skoog, 2001).

El tubo de grafito está rodeado de una camisa metálica enfriada por agua, y dentro de la cual se hace fluir argón o cualquier gas inerte para evitar que el grafito se oxide al calentarse. En la Figura 6 se esquematiza un horno de grafito.

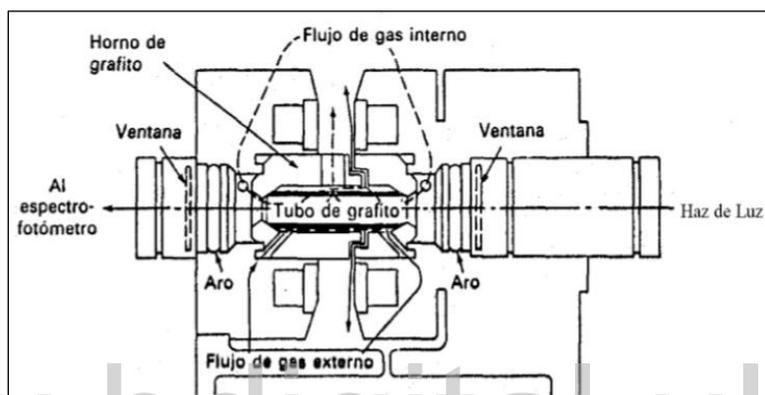
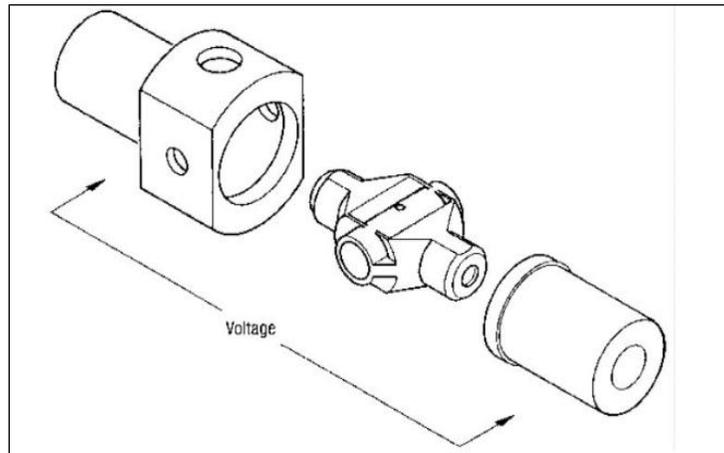


Figura 6. Sección transversal de un horno de grafito. Fuente <https://studylib.es/doc/7913089/fonoamintos-del-an%C3%A1lisis-por-absorcion-atmica>

La parte más importante del horno de grafito es el tubo de grafito, ya que es donde ocurre la atomización del analito. En la actualidad, los tubos de grafito son el producto de muchos adelantos tecnológicos. En el pasado la corriente se hacía pasar de un extremo del tubo al otro longitudinalmente (Figura 7). En algunos hornos modernos, el flujo de corriente, y por ende el calentamiento se lleva a cabo de manera transversal (Figura 8). Esto permite que la atomización ocurra en un ambiente isotérmico, dentro del tubo de grafito, que incrementa la sensibilidad. Además de minimizar casi por completo algunas interferencias causadas por gradientes de temperatura y la condensación de muestra en partes frías del tubo (L'vov, 1978).



**Figura 7. Tubo de grafito de calentamiento longitudinal.** Fuente <https://www.slideshare.net/romypech/aa-y-ea>.



**Figura 8. Tubo de grafito de calentamiento transversal.** Fuente <https://www.freepng.es/png-0laftz>.

Otra mejora es el uso de plataformas de grafito (Figura 9). En este caso, la atomización desde estas plataformas ocurre a una temperatura mucho más constante que al atomizar desde la superficie del tubo mismo, lo cual ayuda a minimizar muchas interferencias químicas Van Loon (2012).



**Figura 9. Tubo de grafito con plataforma de L'vov.** Fuente [http://www.scpscience.com/pdfs/Catalogues/Spanish/Atomic\\_Absorption\\_Supplies\\_SP.Pdf](http://www.scpscience.com/pdfs/Catalogues/Spanish/Atomic_Absorption_Supplies_SP.Pdf).

Existen tres tipos de materiales con los cuales se construyen los tubos de grafito:

- **Grafito normal:** se obtiene del procesamiento y extrusión del coque. Tiene buenas propiedades a excepción que es muy poroso lo que hace que se pierda parte del vapor atomizado, disminuyendo la señal, también presenta efectos de memoria.
- **Grafito normal recubierto con grafito pirolítico:** la capa de grafito pirolítico se puede formar calentando grafito normal a 2800 K en presencia de metano. El grafito pirolítico es mucho menos poroso y de mayor resistencia.

- **Grafito pirolítico:** los tubos se pueden realizar de grafito pirolítico puro para asegurar menor porosidad y mayor durabilidad.

### **Monocromador**

Al determinar la absorbancia de una muestra, solo interesa medir la absorbancia de la radiación a la longitud de onda que absorbe el analito. Por esta razón, se utiliza el monocromador para descartar y escoger una longitud de onda que ha de llegar al detector (Skoog, 2001).

### **Detector**

Es la parte del equipo que transforma la señal de luz proveniente de la fuente de radiación en una señal medible y cuantificable electrónicamente. Normalmente corresponde a un tubo fotomultiplicador, que es capaz de generar una cascada de electrones a partir de un fotón, por lo que genera corriente eléctrica medible, la intensidad de corriente es proporcional a la cantidad de fotones de luz que llegan al detector, por lo tanto, es proporcional a la intensidad de radiación incidente, Skoog (2001). Al determinar mediante el detector la intensidad de radiación incidente antes y después de que dicha radiación haya pasado por la muestra, se puede determinar la cantidad de radiación que fue absorbida por la muestra, calculándose la absorbancia por medio de la ecuación:

$$A = \text{Log} \left( \frac{P_0}{P} \right) \quad (2)$$

donde  $P_0$  es la potencia de la radiación incidente y  $P$  es la potencia de la radiación que logra atravesar la muestra, es decir, la potencia de la radiación que no es absorbida.

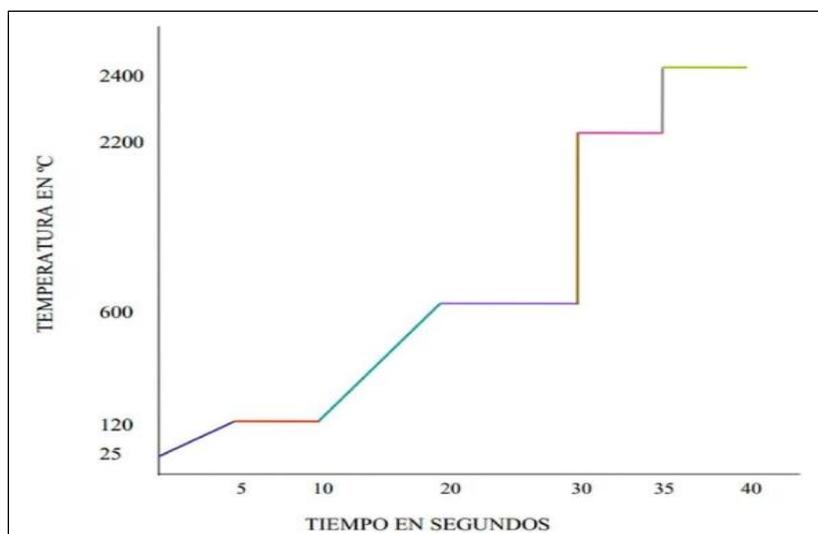
### **Procesador**

Es la parte del equipo que interpreta la señal que sale del detector, la procesa y la presenta en forma comprensible para el operador. Como la mayoría de los instrumentos electrónicos de hoy en día, el procesador es una computadora con una tarjeta de adquisición de datos o software apropiada capaz de interpretar la salida del detector.

### **Programa de calentamiento del ETAAS**

El análisis de una muestra, se realiza mediante un programa de calentamiento, el cual es optimizado para cada tipo de muestra (Figura 10). Dicho programa consiste en una etapa de secado para eliminar solvente, luego una pirólisis, que descompone la matriz, posteriormente la atomización y finalmente la limpieza del tubo de grafito.

Estas etapas se diferencian entre sí por la temperatura, la velocidad con la cual se alcanza dicha temperatura, la duración de la etapa, y el flujo de gas inerte. A continuación, se describen las etapas de calentamiento en ETAAS:



**Figura 10. Programa de calentamiento del horno de grafito.** Fuente <https://studylib.es/doc/4972320/espectroscopia-de-absorcion-atmica-en-horno-de-grafito.pdf>

### Secado

La finalidad de esta etapa es eliminar el solvente en el cual se encuentra disuelto el analito. La temperatura depende del solvente, y normalmente se fija a una temperatura un poco menor al punto de ebullición del mismo. Es importante que la temperatura sea alta para que el solvente se evapore lo más rápido posible, pero no debe exceder el punto de ebullición para evitar sobre ebullición lo que dispersaría la muestra por todo el tubo y posible pérdida por salpicaduras, afectando la precisión y la exactitud del método. Durante esta etapa se mantiene un flujo constante de gas inerte para arrastrar el vapor del solvente fuera del tubo de grafito. La duración de la etapa de secado depende de la velocidad con que se evaporen el o los solventes presentes en la muestra, y evidentemente del volumen de muestra introducido en el tubo (Colmenares, 2012).

### Pirólisis

Consiste en descomponer térmicamente toda la matriz que sea posible, para luego arrastrarla fuera del tubo con el gas inerte. Esta es una gran ventaja con respecto a la atomización en llama, ya que gran parte de la interferencia ocasionada por la matriz de la muestra, pueda ser eliminada sin necesidad de realizar tratamientos previos.

La temperatura de pirólisis depende de la matriz en la cual se encuentre la muestra, si es muy simple (ejemplo una solución acuosa simple) esta etapa puede hacerse a bajas temperaturas y durar muy poco. Para muestras complejas con alto contenido de materia orgánica, las temperaturas de pirólisis varían entre 400-800 °C. Esta es una de las etapas más importantes de análisis, y hay que optimizarla cuidadosamente para cada muestra, de manera tal que pueda descomponerse toda la matriz posible y minimizar pérdida del analito.

Para seleccionar la temperatura óptima de pirólisis, es necesario llevar a cabo pruebas en las cuales se aumenta la temperatura de pirólisis y luego se mide la absorbancia de pico de

una solución estándar del analito. La temperatura óptima es la máxima temperatura que no produzca pérdida del analito y una atenuación de su señal. El tiempo de duración de esta etapa normalmente se encuentra entre 10-30 segundos (Beach, 1988).

### **Atomización**

Esta es la etapa donde se forman los átomos libres individuales del analito, los cuales absorben la radiación. La temperatura de esta etapa va desde la temperatura de pirólisis hasta una temperatura máxima, la cual depende del analito. La temperatura de atomización óptima se escoge midiendo la absorbancia de pico a diferentes temperaturas de atomización, se tomará la temperatura más baja que produzca la mayor absorbancia de pico, con esto también se aumenta la vida útil del tubo debido a que la misma disminuye considerablemente a elevadas temperaturas. A mayor temperatura se producen más átomos libres y así aumenta la absorbancia. Sin embargo, a temperaturas muy elevadas la producción de átomos libres es contrarrestada por la pérdida de los mismos por difusión, y por la expansión de los gases por las paredes del tubo. Por esta razón, la absorbancia de pico disminuye al aumenta la temperatura.

Existen elementos que son volátiles y requieren temperaturas de atomización bajas como el cadmio que se atomiza a 1300 °C y otros que necesitan elevadas temperaturas como el vanadio a 2700 °C. Las temperaturas de atomización para un determinado elemento se cambian utilizando modificadores químicos los cuales pueden estabilizar el analito (aumentando la temperatura de atomización) o formando un compuesto más volátil con el analito, disminuyendo la temperatura de atomización (Beach 1988).

La duración de esta etapa es el mínimo tiempo que se requiere para que se remueva completamente tanto el analito como la matriz del tubo de grafito, este tiempo es seleccionado observando el momento en el que la absorbancia de la señal del analito cae a la línea base y normalmente tiene una duración de 3-5 segundos (Beach, 1988).

### **Limpieza de tubo de grafito**

Una vez terminada la etapa de atomización se procede a una etapa de limpieza cuya finalidad es eliminar todo residuo de la muestra que haya podido quedar adsorbida sobre la superficie del tubo de grafito. Para esta etapa la temperatura se eleva por encima de la temperatura de atomización cercanos a los 2700 °C, de esta manera se evitan fenómenos como el efecto memoria. La duración de esta etapa es de 2 segundos.

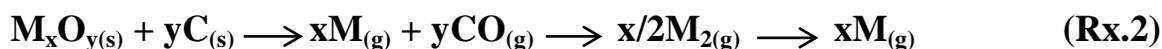
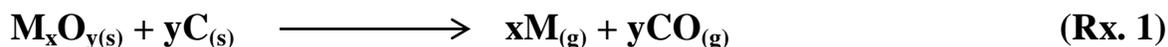
### **Proceso de atomización en el horno de grafito**

Como se describió anteriormente, en la atomización el analito es convertido a átomos gaseosos libres en el horno de grafito, en este proceso, se ve involucrado una serie de reacciones que ocurren a distintas temperaturas, dichas reacciones, dependen de la forma en la que se encuentra el analito en la muestra, es decir, si se encuentra en la forma de nitrato, sulfato, haluro, formando parte de compuestos orgánicos, entre otros. En los casos en que el analito se encuentra en forma de nitrato o sulfato, a medida que aumenta la temperatura se forma un óxido del mismo, incluso algunos haluros se hidrolizan a compuestos oxigenados, para luego convertirse en los respectivos óxidos a altas temperaturas. Por esta razón, la mayoría de los átomos libres formados en el proceso de atomización provienen en su mayoría de óxidos metálicos, o de haluros. Luego que el analito se encuentra en forma de

óxido o haluro, hay varias reacciones que pueden llevar a la obtención del analito atomizado (Sturgeon 1976).

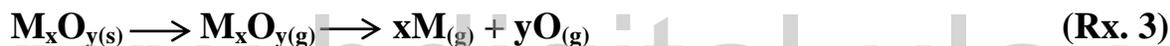
### Reducción con grafito

La reacción del óxido metálico con el carbono del tubo de grafito puede llevar a dos situaciones. La primera, que la reducción del óxido, produzca al analito en forma gaseosa y monóxido de carbono (reacción 1) y la segunda, que se produzca monóxido de carbono y el analito en forma sólida o líquida, tras lo cual el metal pasa a estado gaseoso en forma diatómica y luego esta molécula diatómica se rompa para generar los átomos gaseosos libres (reacción 2).



### Disociación del óxido

Otro posible mecanismo por el cual se pueden generar los átomos libres es mediante la disociación del óxido metálico, luego de que esté haya pasado a estado gaseoso. Este mecanismo no involucra directamente al horno de grafito, sino es un proceso debido solamente a las altas temperaturas (reacción 3).



### Disociación del haluro

Los haluros dan origen a átomos libres del analito mediante un proceso similar a la disociación del óxido, en el cual el haluro primero pasa de la fase condensada (sólido o líquido) a la fase gaseosa, para disociarse y dar origen al halógeno monoatómico y al analito gaseoso (reacción 4). A pesar de que los halógenos suelen presentarse en forma diatómica, esto no se muestra en la reacción debido a que las presiones parciales de la especie monoatómica son demasiado bajas, y la probabilidad de que un átomo de halógeno se encuentre con otro átomo de halógeno para formar la molécula diatómica es despreciable.



### Interferencias en ETAAS

En espectroscopia de absorción atómica se considera interferencia a cualquier sustancia contaminante que afecte de una u otra manera la señal óptima del analito durante el análisis. Existen interferencias distintas entre sí, que afectan la señal de manera similar. Es por esto que al hablar acerca de las interferencias en ETAAS, es necesario en primer lugar clasificar las distintas interferencias posibles.

La IUPAC define dos clases de interferencias básicas: las espectrales y las no espectrales. A su vez, las interferencias espectrales se pueden dividir en absorción de fondo e incandescencia. Las interferencias no espectrales se pueden clasificar según varios criterios, pero en ETAAS la clasificación según la fase o etapa durante la cual las interferencias

afectan la señal es el criterio más ampliamente utilizado. De acuerdo a Matousek (1981) las interferencias no espectrales se clasifican en: interferencias de volatilización del soluto que actúan en la fase condensada e interferencias en la fase de vapor.

### **Interferencias espectrales**

Como ya se señaló, estas interferencias provienen ya sea de la absorción de fondo de especies de la matriz distintas al analito, o de la dispersión de la radiación en el tubo de grafito. Este tipo de interferencias son corregidas utilizando sistemas ópticos de corrección de fondo. Además, también se pueden corregir eliminando a la especie que interfiere. Esto se logra de varias formas, desde procedimientos de precipitación, columnas de intercambio iónico, entre otros, hasta procedimientos propios del horno de grafito tales como la eliminación de las especies que interfieren durante la pirólisis (Matousek, 1981).

### **Absorción de fondo**

La absorción de fondo en el horno de grafito es causada principalmente por absorción molecular y por dispersión de la radiación. La absorción molecular se observa principalmente cuando la matriz contiene haluros de metales alcalinos y óxidos. Estos compuestos pueden presentar una absorción continua proveniente de la disociación de las especies y una absorción electrónica que es mucho más similar a un espectro de líneas, esta clase de absorción se corrige fácilmente con el uso de correctores de fondo de fuente continua, que son las más comunes. Sin embargo, la absorción electrónica de dichas moléculas no es corregida por estos sistemas, sino que en general es necesario el uso de un corrector de Zeeman.

La dispersión de la radiación dentro del tubo de grafito es causada por la formación de una neblina en las partes más frías del tubo, esta neblina está compuesta por pequeñas partículas condensadas que son capaces de dispersar la luz y producir una disminución de la radiación que llega al detector, aparentando mayor absorción (Matousek, 1981).

### **Incandescencia**

El tubo de grafito al ser calentado a elevadas temperaturas emite radiación que concuerda con el modelo de radiación de cuerpo negro, esto trae como consecuencia que el fotomultiplicador recibe más luz de la que proviene de la fuente, lo que causa que la absorbancia registrada sea menor que la real. Este efecto es máximo a la longitud de onda de máxima intensidad de emisión predicha por la Ley de Desplazamiento de Wien a la temperatura de atomización. Este tipo de interferencia se corrige fácilmente por la electrónica del espectrómetro, pero hay casos en los que la intensidad de emisión del tubo es tan alta que satura el tubo fotomultiplicador y la corrección deja de ser posible, en este caso, es necesario escoger otra línea de absorción para el analito que se está determinando, (Beach, 1988).

### **Interferencias no espectrales**

Como se mencionó anteriormente estas interferencias se pueden clasificar según la fase la cual interfieren. En el horno de grafito, las fases relevantes son la fase condensada y la fase de vapor.

### **Interferencias de volatilización del soluto**

Estas interferencias afectan la fase condensada durante el análisis, es decir, que afectan el analito antes de que este sea atomizado. Existen dos clases principales de interferencias de volatilización de soluto, que son de origen químico: la formación de compuestos volátiles y formación de compuestos refractarios (Matousek, 1981).

La matriz puede tener sustancias químicas que reaccionan con el analito para formar compuestos muy volátiles, los cuales se pierden completa o parcialmente durante las etapas previas a la atomización, es decir, el secado y la pirólisis. El efecto que generan estas interferencias es que disminuye la cantidad de analito presente en la atomización con lo que la señal se ve atenuada, en la mayoría de los casos se debe a la presencia de haluros en la matriz, formando haluros con el analito que en general son muy volátiles.

El otro caso cuando la matriz posee elementos que forman compuestos refractarios con el analito, generalmente óxidos, los cuales son difíciles de descomponer incluso a altas temperaturas, con lo cual no todo el analito es atomizado y la señal se ve atenuada, (Matousek, 1981).

Los efectos de la viscosidad y la tensión superficial de la solución que se analiza son mínimos en el horno de grafito, pero interfieren en la volatilización del soluto afectando la etapa de secado. Una muestra con baja tensión superficial o baja viscosidad, se escurrirá a lo largo del tubo alternando el lugar donde se seca la muestra y por lo tanto el lugar desde donde se vaporiza y atomiza el analito, ya que, si el analito se vaporiza muy cerca de los extremos del tubo, tenderá a escaparse disminuyendo la señal de absorbancia.

### **Interferencias de la fase de vapor**

Existen diversas vías para la formación de átomos libres del analito, algunas de ellas implican la evaporación de especies como óxidos o haluros del analito, tanto estas especies como el analito atomizado, pueden reaccionar en fase gaseosa con los elementos de la matriz, dando origen a compuestos que no absorben radiación, disminuyendo la absorbancia del analito. Una vez más los haluros y en especial los cloruros son las especies que ocasionan mayor interferencia de este tipo (Matousek, 1981).

### **Correctores de fondo**

Todo equipo de espectroscopía de absorción atómica debe poseer un sistema de corrección de fondo, cuya función es diferenciar la absorción de la radiación que es debida al analito de aquella que es causada por las demás especies presentes en la matriz de la muestra, es decir la absorción de fondo. Este sistema es de gran importancia, ya que normalmente a las longitudes de onda en las que absorben los diferentes elementos, siempre hay alguna especie, ya sea atómica o molecular que absorbe también la radiación, lo que trae como consecuencia que la absorbancia obtenida no se corresponda con la concentración del analito, por lo tanto, es necesario eliminar la contribución del fondo a la absorbancia de la muestra para obtener exclusivamente la absorbancia del analito.

Los tipos más comunes de sistema de corrección de fondo son los que utilizan una fuente de radiación continua, los que utilizan la misma lámpara de cátodo hueco y los que se basan en el efecto Zeeman.

### **Corrector de lámpara de deuterio**

Es el sistema de corrección de fondo más antiguo, se basa en el uso de una fuente de radiación continua (lámpara de deuterio), para determinar la absorbancia del fondo se hace incidir sobre la muestra atomizada una banda de radiación a la longitud de onda del analito. La luz es absorbida tanto por el fondo como por el analito, pero como el analito solo absorbe a una determinada longitud de onda y el fondo absorbe toda la banda de longitudes de onda. La absorción por parte del analito es despreciable y se considera que la absorbancia se debe solamente al fondo. Finalmente, para obtener la absorbancia debida solo al analito, basta con restar la absorbancia de la radiación de la LCH (que incluye la absorción del analito y del fondo) menos la absorbancia de la radiación de la lámpara de deuterio (que solo corresponde a absorción de fondo). Debido a que se utiliza una fuente separada para determinar la absorbancia de fondo este método es uno de los menos precisos, sin embargo, proporciona una buena corrección siempre y cuando la absorción del fondo sea continua a la longitud de onda del analito (Skoog, 2001).

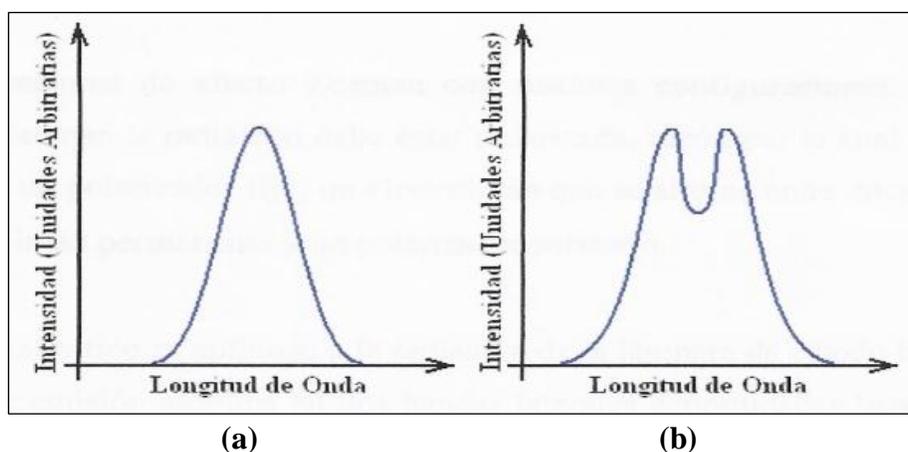


**Figura 11. Lámpara de deuterio. Fuente**  
<http://www.teknokroma.es/es/Productos/cromatografia-de-hplc/5/lamparas-de-deuterio-teknokroma/116/782/lamparas-de-deuterio.aspx>

### **Corrector de Smith-Hieftje**

Este sistema de corrección de fondo recibe su nombre en honor a Stanley B. Smith y Gary M. Hieftje quienes lo inventaron y desarrollaron. Se basa en alternar el funcionamiento de la lámpara de cátodo hueco con la que se está analizando la muestra entre alta corriente y baja corriente, cuando la lámpara funciona a alta corriente ocasiona un aumento en el número de átomos libres dentro de la misma, los cuales absorben radiación que emite la lámpara. Dicho proceso se conoce como autoabsorción de la lámpara de cátodo hueco y hace que la línea de emisión de la lámpara (Figura 12 a) se separe en dos bandas laterales (Figura 12 b) que no son absorbidas por el analito, pero sí por el fondo. Los espectrómetros equipados con este sistema de corrección lo que hacen es alternar entre baja corriente para

el analito y alta corriente para el fondo, al final, se resta la absorbancia a baja corriente menos la absorbancia a alta corriente y se obtiene la absorbancia correspondiente solo al analito (Skoog, 2001).



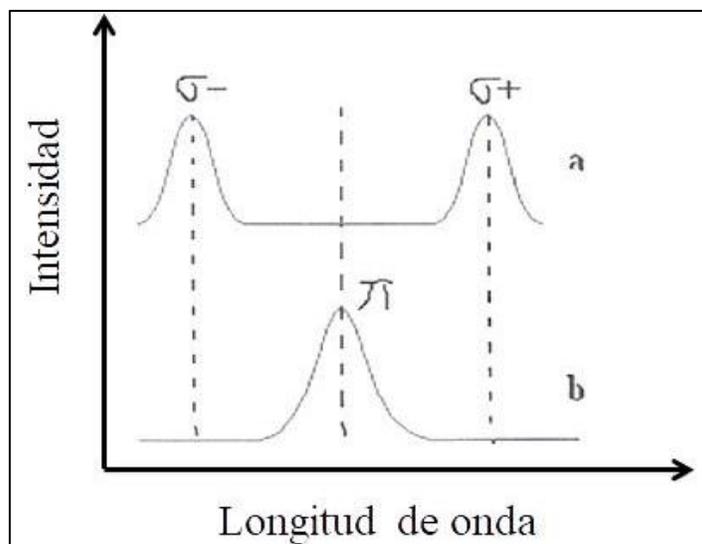
**Figura 12. (a) Intensidad de emisión de LCH en funcionamiento normal (baja corriente). (b) Intensidad de emisión de LCH alta corriente. Fuente Skoog (2001).**

### **Efecto Zeeman**

Los correctores de efecto Zeeman son los correctores de fondo por excelencia, ya que permiten el uso de la misma radiación de la LCH y no requieren del uso de fuentes de radiación separadas, lo cual permite una muy buena precisión en la corrección de fondo. A diferencia del corrector de fondo de lámpara de deuterio, este sistema corrige muy bien la absorción de fondo aun cuando dicha absorción presente líneas cerca de la longitud de onda del analito. La única desventaja que tiene este sistema es que es muy costoso debido a la necesidad de obtener grandes campos magnéticos, ya sea por medio de electroimanes o imanes permanentes, que generan un incremento en el precio de los equipos que posean este corrector.

Para que se logre observar el efecto Zeeman la radiación debe estar polarizada, razón por la cual se pueden construir equipos que posean un polarizador fijo, un electroimán que se alterne entre encendido y apagado o se utiliza un imán permanente y un polarizador rotatorio.

Un campo magnético es aplicado a la radiación de la lámpara de LCH con lo cual se desdobra la línea de emisión atómica en dos bandas laterales denominadas bandas sigma ( $\sigma$ ), dichas bandas están a longitudes de onda muy cercanas a la longitud de onda original, pero no se solapan. Por esta razón la radiación no es absorbida por el analito sino exclusivamente por el fondo. Cuando el campo magnético está ausente, la radiación no se desdobra y es absorbida por el analito y el fondo. Finalmente, se resta la absorbancia con el campo magnético apagado (absorbancia total) menos la absorbancia con el campo magnético encendido (absorbancia del fondo) para obtener únicamente la absorbancia del analito (Skoog, 2001). De igual manera ocurre el desdoblamiento de la línea atómica pero en la absorción.



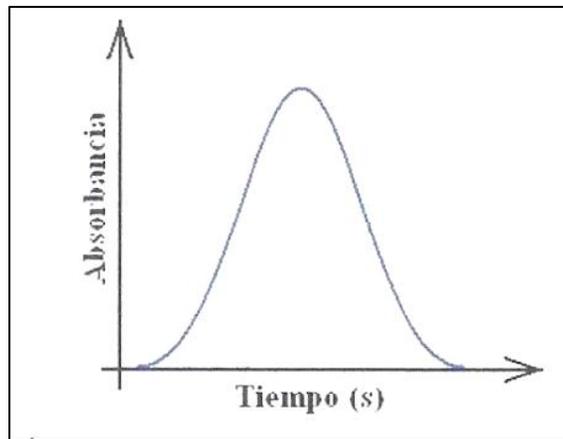
**Figura 13. Desdoblamiento de la línea de emisión atómica (efecto Zeeman). Fuente <https://www.google.com/amp/s/slideplayer.es/amp/115838/>**

### **Modificadores químicos**

Como se mencionó anteriormente, los correctores de fondo son capaces de eliminar casi en su totalidad las interferencias del tipo espectrales, en particular la absorción de fondo. Esto es en el caso de los correctores Zeeman. Sin embargo, las interferencias no espectrales no son corregidas por estos métodos. Para eliminar las interferencias no espectrales en la técnica con horno de grafito se utilizan modificadores químicos los cuales pueden afectar bien sea al analito, o a los elementos de la matriz según sea necesario. Por ejemplo, en los casos en los que el analito es muy volátil, se emplean modificadores que formen compuestos con el analito que sean más estables térmicamente, permitiendo el uso de mayores temperaturas de pirólisis para descomponer la matriz. Tal es el caso de los modificadores preparados en base a los elementos del grupo del paladio. El paladio combinado con el magnesio conforma uno de los modificadores de matriz más ampliamente utilizados, lo que le ha ganado el nombre de modificador universal, ya que es efectivo en una gran variedad de tipos de muestras afirma Kowalewska *et al.* (1999). En el caso que el analito, o los óxidos del analito sean refractarios, es decir, que no se descompongan térmicamente, es necesario de igual manera utilizar modificadores de matriz para que formen compuestos más volátiles con el analito. De tal manera que no hay necesidad de utilizar temperaturas de atomización demasiados altas, y además para evitar que queden depósitos del analito en la superficie del tubo (Matousek, 1981).

### **Medición de la señal en ETAAS**

Una de las cosas que distingue al horno de grafito de las demás técnicas espectroscópicas de absorción atómica es que la señal de absorbancia es discreta y no continua como en el caso de FAAS. Al analizar una muestra por ETAAS, el equipo registra una curva de absorbancia vs tiempo al alcanzar la temperatura de atomización del analito. Al principio, hay poca absorbancia porque apenas se ha empezado a atomizar la muestra, luego aumenta cuando aumenta la cantidad de muestra atomizada, y finalmente disminuye otra vez cuando la muestra totalmente atomizada se pierde por los extremos del tubo de grafito.



**Figura 14. Curva de atomización en horno de grafito. Fuente <https://www.google.com/amp/s/slideplayer.es/amp/115838/>**

Los espectrómetros de absorción atómica con horno de grafito, se pueden programar para que midan la señal del analito bien sea como la absorbancia máxima del pico o como el área del pico. Como distintas velocidades de atomización darán como resultado señales de absorciones anchas o angostas, es de esperarse que para una misma cantidad de analito, al variar la velocidad de atomización, se modifica la absorbancia del máximo de la señal, lo que puede llevar a error. Esto se puede corregir tomando como medida de la señal de analito, el área bajo la curva, que representa la absorbancia de toda la muestra atomizada.

Como en esta técnica se atomiza cerca del 100 % de la muestra que se va a analizar, se pueden obtener una señal, a partir de una cantidad muy pequeña de analito, del orden de trazas, utilizando volúmenes muy pequeños de muestra. Esto es importante en el estudio de muestras de las cuales se tiene muy poca cantidad, ya que la técnica es destructiva, y no se pueden recuperar dichas muestras después del análisis. Cabe resaltar, que existen analitos que se atomizan rápidamente y producen picos de absorción muy altos, los cuales proporcionan mejor precisión que la medida del área, lo que demuestra la versatilidad del horno de grafito, ya que se puede elegir entre el modo de altura de pico y área de pico según sea conveniente (Sturgeon, 1976).

### **Límite de detección**

El límite de detección es la mínima cantidad de analito que produce una señal diferenciable del blanco. Se calcula como la concentración que produce una señal en el equipo igual a la señal del blanco más tres veces su desviación estándar. Los límites de detección para la técnica de horno de grafito se suelen presentar de dos maneras distintas. Una es como límite de detección absoluto, o la mínima cantidad en picogramos (pg) que se pueda detectar de un elemento en particular, y la otra es como concentración mínima que se pueda detectar. Para esta última, puede haber varios valores para el mismo elemento, dependiendo del volumen de muestra que se introduzca en el horno, por esta razón, muchas compañías intentan hacer que sus equipos sobresalgan respecto a otros presentando el límite de detección en concentración ( $\mu\text{g/L}$ ) para volúmenes altos de muestra. El límite de detección se determina midiendo la señal del blanco y aplicando la siguiente ecuación:

$$LD = \frac{3S_{blanco}}{m_{curva\ de\ calibración}} \quad (3)$$

### Límite de cuantificación

A diferencia del límite de detección, el límite de cuantificación es la mínima cantidad de analito que se puede medir con cierto nivel de confianza (Skoog, 2001). El hecho de que a concentraciones muy bajas el equipo produzca una señal (límite de detección) no implica que dicha señal se pueda medir con precisión, aunque el analito esté presente. El límite de cuantificación se determina midiendo la señal del blanco, calcular su respectiva desviación estándar y luego aplicar la siguiente ecuación:

$$LC = \frac{10S_{blanco}}{m_{curva\ de\ calibración}} \quad (4)$$

### Precisión

La precisión del método está relacionada con la desviación estándar relativa, lo cual da una idea de la dispersión, reproducibilidad o concordancia de los datos experimentales alrededor del promedio, mide el error aleatorio o indeterminado de un análisis. Estadísticamente, la precisión de un método se describe mediante términos como; la desviación estándar absoluta (s), desviación estándar relativa (RSD) y la varianza (s<sup>2</sup>). Para realizar el cálculo de la RSD se utiliza la siguiente fórmula:

$$RSD = \frac{X_{promedio}}{S_{desviación\ estandar}} * 100 \quad (5)$$

El método de absorción atómica con horno de grafito tiene una alta precisión para muestras líquidas, pero para muestras sólidas la precisión es inferior debido a la poca homogeneidad en comparación a las muestras líquidas, además para muestras sólidas existe el problema de que la cantidad utilizada de muestra no sea representativa del resto. Por medio de esta técnica se pueden tener precisiones entre 1 y 5 % sin muchas dificultades afirman Slavin (1986) y de Mattos *et al.* (2005).

### Cantidad de muestra

Debido a que en esta técnica prácticamente todo el analito que se introduce se atomiza, se requieren cantidades muy pequeñas de muestra para realizar un análisis, en general entre 20-100 µL son suficientes para la mayoría de elementos, también, se evita el proceso de preconcentración y las muestras sólidas sólo requieren unos pocos miligramos por análisis (Slavin, 1986).

### Comparación con otras técnicas espectroscópicas

Como se mencionó anteriormente, existen varias técnicas que permiten la determinación de cadmio a nivel traza. En la Tabla 7 se realiza una comparación entre las técnicas espectroscópicas de absorción atómica más utilizadas en la determinación de dicho elemento.

Como se observa, la técnica de llama (FAAS) proporciona muy buena precisión a muy bajo costo, no obstante, no proporciona los límites de detección adecuados para la determinación de cadmio en licor de cacao ya que se encuentra en niveles trazas. Por otra parte, la técnica de horno de grafito (ETAAS) como la técnica de (ICP-AES) permite la obtención de excelentes límites de detección con muy buena precisión. Sin embargo, debido al alto costo del equipo de (ICP-AES) e (ICP-MS), hace que pocos laboratorios cuenten con capacidad de utilizar esta técnica, con lo cual el horno de grafito es de más amplio uso. Por esta razón se utilizará la técnica (ETAAS) para la determinación de cadmio en licor de cacao.

**Tabla 7. Comparación entre técnicas espectroscópicas**

|                           | <b>FAAS</b>                 | <b>ETAAS</b>             | <b>ICP-AES</b>            | <b>ICP-MS</b>                    |
|---------------------------|-----------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| Cantidad de muestra       | 10-15 segundos por elemento | 3-4 minutos por elemento | 6-60 elementos por minuto | 2-5 minutos todos elementos      |
| Límite de detección       | Regular-bueno               | Excelente                | Muy bueno                 | Excelente                        |
| Rango dinámico            | 10 <sup>3</sup>             | 10 <sup>2</sup>          | 10 <sup>5</sup>           | 10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup> |
| Precisión                 | 0,1-1 %                     | 1-5 %                    | 0,1-2 %                   | 1-3 %                            |
| Interferencias            |                             |                          |                           |                                  |
| Espectrales               | Raras                       | Muy pocas                | Comunes                   | Raras                            |
| Químicas                  | Muchas                      | Muchas pero controlables | Pocas                     | Moderadas                        |
| Ionización                | Regular                     | Mínima                   | Común                     | Mínima                           |
| Físicas                   | Algunas                     | Muy pocas                | Muy pocas                 | Algunas                          |
| Efecto masas              | Ninguna                     | Ninguna                  | Ninguna                   | Muchas                           |
| Isotópicas                | Ninguna                     | Ninguna                  | Ninguna                   | Muchas                           |
| Sólidos disueltos         | 0,5-5 %                     | Hasta 20 %               | 2-25 %                    | 0,1-0,4 %                        |
| Elementos identificables  | 68+                         | 50+                      | 73                        | 76                               |
| Volumen de muestra        | Alta                        | Muy baja                 | Medio                     | Baja                             |
| Análisis semicuantitativo | No                          | No                       | Si                        | Si                               |
| Análisis isotópico        | No                          | No                       | No                        | Si                               |
| Facilidad de uso          | Muy fácil                   | Moderadamente            | Fácil                     | Moderadamente                    |
| Operación automática      | No                          | Si                       | Si                        | Si                               |
| Costo de inversión        | Bajo                        | Mediano                  | Alto                      | Muy alto                         |
| Costo de operación        | Baja-medio                  | Medio-alto               | Alta                      | Muy alta                         |
| Costo por análisis        | Bajo                        | Mediano                  | Alto                      | Alto                             |

#### **Antecedentes determinación de cadmio**

La contaminación que se produce por cadmio en el grano y en los productos derivados, probablemente se origine en las fases de siembra, cosecha y procesamientos. Por lo tanto, resulta de suma importancia saber reconocer cuál es la fuente de contaminación, con el objetivo de determinar tanto la calidad de los productos como las medidas que se deben tomar para evitar su contaminación. Para esto, es necesario llevar a cabo una evaluación de la presencia de cadmio en cacao. En esta investigación se ha centrado la atención a la evaluación en el grano de cacao y sus derivados primarios a nivel de laboratorio.

A continuación, se presenta una compilación de algunas de las investigaciones más relevantes sobre cadmio y cacao, donde se hace uso de diferentes técnicas y metodologías analíticas modernas con énfasis en los límites de detección, interferencias, precisión y exactitud.

Conviene recordar que el cadmio es un elemento no esencial para las plantas y su absorción se debe al transporte mediante procesos específicos y no específicos utilizados para iones como el  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (Shahid *et al.*, 2016). Después de la absorción por el sistema radicular,  $\text{Cd}^{2+}$  es transportado al xilema para llegar a las hojas. En las hojas  $\text{Cd}^{2+}$  es transportado activamente al floema desde donde llega a los frutos (Shahid *et al.* 2016; Clemens *et al.*, 2013).

En este sentido, en el año 2012 Rehman y Husnain realizaron un estudio mediante espectrofotometría de absorción atómica (AAS) donde evaluaron 32 productos de chocolates preparados por diferentes compañías nacionales y multinacionales. Las muestras fueron tratadas con una mezcla de ácidos  $\text{HNO}_3$  y  $\text{HClO}_4$  5:1,5 en un balón de digestión con calentamiento. En esta investigación se obtuvieron como resultados que la concentración de Cd en el cacao en polvo era la más alta 190  $\mu\text{g/L}$ , mientras que la concentración media en los chocolates a base de cacao fue 46,4  $\mu\text{g/L}$ . En los chocolates con azúcar, la concentración media de Cd fue 40,7  $\mu\text{g/L}$ , y en las muestras de chocolates a base de leche fue de 33  $\mu\text{g/L}$ .

Por otra parte, en 2014 Javier *et al* determinaron mediante espectroscopia de absorción atómica en horno de grafito (GFAAS) la concentración de cadmio y plomo y su relación con el contenido de cacao en chocolates comercializados en Brasil, para ello realizaron un estudio de distintos modificadores químicos durante el desarrollo del método. Los autores examinaron 30 muestras las cuales fueron tratadas con digestión ácida, asistida con microondas. Las concentraciones de Cd variaron entre 1,7 y 107,6 ng/g. Los resultados indican que los chocolates oscuros tienen mayor concentración de Cd y Pb que los chocolates con leche y blancos. Además, se analizaron muestras con cinco contenidos diferentes de cacao (entre 34 y 85 %), observándose correlaciones lineales entre el contenido de cacao y la concentración de Cd.

Simultáneamente Yanus *et al.* (2014), determinaron por ICP-MS las concentraciones de ocho elementos: Pb, Cd, Cr, Mn, Co, As, Bi y Mo, en chocolate, los granos y productos de cacao. Las muestras se trataron por medio de una digestión con una mezcla 1:2 de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30 % y  $\text{HNO}_3$  concentrado. La mezcla se calentó en un baño de agua, se filtró para eliminar los lípidos y se utilizó In como patrón interno para corregir los efectos de la matriz. En el estudio se examinaron muestras de chocolate de diferentes marcas y países con diferentes concentraciones de sólidos de cacao de cada marca. Se encontró una correlación lineal entre el nivel de varios elementos traza en el chocolate y el contenido de sólidos de cacao, así como niveles significativos de Bi y As en las cáscaras de los granos de cacao, pero no en los granos de cacao y el chocolate. Esto puede atribuirse a la contaminación ambiental. La presencia de otros elementos se atribuyó a los procesos de fabricación de productos de cacao y chocolate.

En el año 2015 Chávez *et al.*, realizaron un estudio cuyo objetivo fue determinar el estado del Cd en suelos y plantas de cacao mediante el uso de un ICP-OES en el sur de Ecuador. Se recogieron muestras de suelo de 19 granjas a profundidades de 0-5, 5-15, 15 - 30 y 30 - 50 cm, mientras que se tomaron muestras de plantas de cuatro árboles cercanos. El Cd total recuperable y extraíble se midió a diferentes profundidades del suelo. El Cd recuperable total varió de (0,88 - 2,45) mg/kg y (0,06 - 2,59) mg/kg. El Cd en los tejidos de cacao disminuyó en el orden de los granos > cáscara >> hojas. El contenido de Cd en los granos de cacao varió de (0,02 - 3,00) mg/kg, en promedio 0,94 mg/kg y 12 de 19 sitios tuvieron contenido de Cd en grano por encima del nivel crítico. La concentración de Cd del grano estuvo altamente correlacionada con el Cd extraíble con Mehlich 3 (M3) o HCl en las profundidades de 0 - 5 y 5 - 15 cm ( $r = 0,80$  y  $0,82$  para M3, y  $r = 0,78$  y  $0,82$  para HCl;  $P < 0,01$ ). Estos resultados indican que la acumulación de Cd en las capas superficiales da como resultado un Cd excesivo en los granos de cacao y el Cd extraíble con M3 o HCl son métodos adecuados para predecir el Cd disponible en los suelos estudiados.

En el año 2016 Bertoldi *et al.* notifican sobre el contenido de 56 macro, micro y oligoelementos de 61 granos de cacao producidos en 23 países de África Oriental y Occidental, Asia y América Central y del Sur, las muestras fueron tratadas mediante digestión ácida con  $\text{HNO}_3$  asistida con microondas y analizadas utilizando ICP-MS. Los autores probaron la eficacia y robustez de un nuevo enfoque quimiométrico de trazabilidad desarrollada sobre la base de perfiles elementales. El modelo basado en 29 elementos (Ag, As, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Ga, Hg, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, P, Rb, Se, Sr, Th, Tl, U, Y y Zn) indicados como los más predictivos por el análisis. Los resultados proporcionaron una óptima clasificación entre los cinco orígenes subcontinentales, logrando el 100 % de la reclasificación correcta. El modelo fue validado de forma cruzada con resultados satisfactorios (> 85 % de reclasificación correcta). En esta investigación se han obtenido resultados satisfactorios por la aplicación del modelo en el rastreo del origen subcontinental de 13 muestras comerciales de chocolate negro (77 % de reclasificación correcta).

Al mismo tiempo Chávez *et al.* (2016), usaron el enfoque de fraccionamiento del suelo para identificar las reservas de Cd disponibles en los suelos y correlacionar estas reservas de Cd con la concentración de Cd del grano y los índices de prueba del suelo. El tratamiento de la muestra en el caso de los granos de cacao se realizó mediante una digestión ácida con  $\text{HNO}_3$  con calentamiento hasta  $140\text{ }^\circ\text{C}$  por 180 min, todas las muestras fueron analizadas con el uso de un ICP-OES. Los resultados muestran que la distribución de las fracciones de Cd del suelo disminuyó en el orden: oxidable > soluble en ácido > residual > reducible >> soluble en agua. Las fracciones oxidables y solubles en ácido representaron el 59 y el 68 % del Cd recuperable total para la profundidad del suelo de 0-5 y 5-15 cm, respectivamente. La fracción soluble en ácido estuvo estrechamente relacionada con el Cd de frijol, con coeficientes de correlación (R) de 0,70 y 0,81 ( $p < 0,01$ ) para la profundidad del suelo de 0-5 y 5-15 cm, respectivamente. Además, la fracción de Cd soluble en ácido es una parte importante del conjunto de Cd disponible. Dado que aproximadamente el 60 % del Cd en los suelos de cultivo de cacao está relacionado con la fracción soluble en ácido y está unido a la materia orgánica, la remediación de los suelos contaminados debe tener en cuenta la dinámica del pH del suelo y el contenido de materia orgánica.

Al mismo tiempo Ramtahal *et al.* (2016), relacionaron los niveles de Cd en los tejidos de la planta de cacao y los suelos de las áreas de cultivo de cacao en Trinidad y Tobago. Se determinaron las concentraciones totales (extraíbles con HNO<sub>3</sub>) de Cd tanto en tejidos como en suelos. Los niveles de cadmio medidos por espectroscopia de absorción atómica variaron en el orden: hojas > vainas > cáscaras > granos > suelo. Además, también se identificaron relaciones positivas significativas ( $p < 0,05$ ) entre el Cd en los tejidos de cacao y los niveles de Cd extraíbles con HNO<sub>3</sub> total correspondiente en los suelos.

Gramlich *et al.* (2016) encontraron que las concentraciones de Cd en granos de algunas procedencias de cacao, especialmente de América Latina, excedían los valores permisibles por la Unión Europea (UE). La absorción de cadmio por el cacao no solo depende de una variedad de factores del suelo, sino también de factores de planta y manejo. En este estudio, se investigó la influencia de diferentes sistemas de producción en la absorción de Cd por el cacao en un ensayo de campo a largo plazo en la región de Alto Beni de Bolivia, donde los árboles de cacao se cultivan en monocultivos y en sistemas agroforestales, tanto bajo manejo orgánico convencional. Se tomaron muestras de hojas, frutos y raíces de dos cultivares de cada sistema de producción junto con muestras de suelo recolectadas alrededor de estos árboles. Se analizaron muestras de hoja, cáscara y grano para Cd, Fe y Zn, todas las muestras se trataron con HNO<sub>3</sub> y microondas y analizadas con espectrómetro de absorción atómica en llama. Solo una pequeña parte de la variación en el Cd de la cáscara y del grano se explicó por factores de manejo, suelo y plantas. Además, los sistemas de producción y los cultivares solos, no tuvieron influencia significativa en el Cd de la hoja. Sin embargo, se encontró menores contenidos de Cd de hojas en sistemas agroforestales que en monocultivos cuando se analizan en combinación con Cd de suelo, cultivo de cacao y materia orgánica del suelo disponibles para gradientes difusivos en películas delgadas (DGT). En general, este modelo explicó el 60 % de la varianza de las concentraciones de Cd en la hoja. Explicaron las concentraciones más bajas de Cd en las hojas en los sistemas agroforestales mediante la competencia por la absorción de Cd con otras plantas. El efecto del cultivar puede explicarse por las capacidades de absorción específicas del cultivar o por un efecto de crecimiento que se traduce en diferentes tasas de absorción, ya que los cultivares eran de diferente tamaño.

Posteriormente, Arevalo-Gardini *et al.* (2017), investigaron la distribución y acumulación de metales pesados en las hojas y granos de cacao en las tres principales regiones de cultivo del Perú. El estudio se realizó en plantaciones de cacao de 10 a 15 años en la región Norte (Tumbes, Piura, Cajamarca y Amazonas); Centro (Huánuco y San Martín) y Sur (Junín y Cuzco). Se recogieron muestras de hojas y granos de cacao de 70 plantaciones de cacao y se registró la naturaleza del clon de cacao o el genotipo muestreado. Las concentraciones de metales pesados tales como Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn en hojas y granos se determinaron usando un espectrofotómetro de absorción atómica. En general, las concentraciones de metales pesados estaban por debajo de los límites críticos. Sin embargo, la presencia de altos niveles de Cd en el cacao cultivado en las regiones de Amazonas, Piura y Tumbes es una preocupación primordial. Las plantaciones de cacao con diferentes clones de cacao muestran diferencias en la acumulación de Cd tanto en las hojas como en los granos de cacao. Además, la sinergia entre Zn y Cd presente tanto en la planta como en el suelo sugiere que Zn tiene un efecto directo sobre la acumulación de Cd en el cacao.

Del mismo modo, Lo Dico *et al.* (2017), evaluaron las concentraciones de As, Sb, Cd, Cr, Pb, Se y V en cacao en polvo y chocolate mediante la validación de un método ICP-MS, las muestras fueron tratadas con HNO<sub>3</sub> asistida con microondas. Para el caso del Cd la concentración máxima en el cacao en polvo fue de (0,303 ± 0,035) mg/kg, en el caso de chocolate > 50 % de cacao (0,207 ± 0,027) mg/kg, para chocolate < 50 % >30 % de cacao (0,040 ± 0,006) mg/kg y para chocolate < 30 % de cacao (0,050 ± 0,006) mg/kg.

Por otra parte, Chaparo *et al.* (2017), determinaron el contenido de Cd en chocolate de mesa en polvo y granulado, elaborado y comercializado en el municipio de Chiquinquirá, Boyacá-Colombia, empleando el método de voltamperometría diferencial de pulso de redisolución anódica (PDASV). Las muestras se depositaron en crisoles previamente tarados, a una temperatura de 400 °C durante 8 h. Las cenizas obtenidas fueron sometidas a un proceso de digestión ácida con HNO<sub>3</sub>, HCl y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, se llevaron a sequedad y se disolvieron con HCl concentrado, se filtraron y se lavaron con agua caliente hasta un volumen de 10 mL. Previamente, se validaron los parámetros de este método, evaluando selectividad, linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud con resultados satisfactorios: selectivo a un rango de potencial de (0,54 a 0,64) V, (R<sup>2</sup> > 0,95; % C.V < 10 %; % R > 80 %). El análisis de varianza mostró que no existen diferencias estadísticas significativas (p < 0,05) entre los resultados. La cuantificación de cadmio en muestras de chocolate granulado y en polvo mostró valores de concentración entre (214 - 260) ppb, registrando las concentraciones más altas el chocolate en polvo.

Para finales del 2017 Barraza *et al.*, investigaron el contenido de Cd en suelos y cacao cultivados en el Ecuador, en áreas afectadas por actividades petroleras. Se colectaron muestras de suelos, hojas de cacao y granos de 31 granjas en las regiones costeras del norte del Amazonas y el Pacífico expuestos a la producción y refinación de petróleo y se compararon con dos áreas de control. La bioaccesibilidad gástrica humana se determinó en granos de cacao crudo y muestras de licor de cacao para evaluar los riesgos potenciales para la salud. Todas las muestras fueron analizadas mediante la técnica de ICP-MS. Los resultados muestran que las capas superiores del suelo (0 - 20 cm) tienen concentraciones de Cd más altas que las capas más profundas, excediendo el límite de la legislación ecuatoriana en el 39 % de los sitios de muestreo. Las hojas de cacao acumulan más Cd que las cáscaras o los granos. Sin embargo, el 50 % de los granos muestreados tienen contenidos de Cd superiores a 0,8 mg/kg. La transferencia de la raíz al cacao parece ser la principal vía de absorción de Cd, que no solo está regulada por las propiedades fisicoquímicas del suelo sino también por las prácticas agrícolas. Además, el enriquecimiento de Cd natural por insumos volcánicos no debe ser descuidado. Finalmente, el Cd en los árboles de cacao no puede considerarse como un rastreador de las actividades petroleras. Suponiendo que el contenido total de Cd y su fracción bioaccesible (hasta 90 %) en los granos y el licor de cacao está directamente relacionado con los del chocolate.

Ya en 2018 Gramlich *et al.*, analizaron los factores que rigen la captación de Cd por el cacao, estudiaron 55 granjas de cacao en Honduras en las que determinaron mediante espectroscopia absorción atómica con horno de grafito las concentraciones de Cd en las hojas de cacao, las cáscaras y los granos. Los investigadores analizaron sus resultados con una variedad de factores circundantes al suelo y al sitio. En un promedio de (2,6 ± 0,4) mg/kg, las concentraciones de Cd fueron más altas en las hojas que en los granos. Sin

embargo, las concentraciones de Cd en los granos superaron el límite propuesto por la UE, además, mostró grandes diferencias entre sustratos geológicos, aunque las variaciones regionales en el total de Cd del suelo fueron comparativamente pequeñas y el promedio de concentración fue en el rango de suelos contaminados ( $0,25 \pm 0,02$ ) mg/kg.

De igual modo Abt *et al.* (2018), realizaron una investigación que tuvo como objetivo evaluar las concentraciones de Cd y Pb en productos de cacao en polvo, chocolate negro, chocolate con leche y semillas de cacao en los EEUU, la relación entre el porcentaje de sólidos de cacao y con el origen informado del cacao en polvo y los productos de chocolate. Para ello las muestras se trataron mediante digestión ácida en una relación 5:1 de HNO<sub>3</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> asistida con microondas y analizadas mediante el uso de ICP-MS. Los resultados muestran que el Cd varió de (0,004 - 3,15) mg/kg, además, se observó variación geográfica para el Cd, encontrándose concentraciones más altas de Cd en productos reportados como originarios de América Latina que los de África. La influencia del porcentaje de sólidos de cacao y el origen del cacao en los niveles de Cd son relevantes para los estándares internacionales para Cd en productos de chocolate.

En ese mismo año Kruszewski *et al.* (2018), estudiaron la contaminación de Cd, Pb y Ni en cacao crudo y durante la fabricación de chocolate, en tres empresas diferentes. Las muestras se digirieron con HNO<sub>3</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por medio de microondas, en el caso de Cd y Pb se analizaron mediante horno de grafito (GFAAS) y Ni por ICP-AES. La reducción total observada en los niveles de metales varía según la línea de producción (10,5 - 33 % Cd, 0 - 100 % Pb, 11 - 42 % Ni). Se observó que los dos pasos que tienen el mayor impacto en la disminución de la concentración de estos metales es la eliminación de la cáscara del grano de cacao y el conchado. El chocolate obtenido de uno de los productores planteó un peligro en términos de su contenido de cadmio (0,43 mg/kg). Por lo tanto, los productos de chocolate deben ser monitoreados constantemente y un límite absoluto debe establecerse con respecto a los niveles permisibles de metales pesados. Esta investigación proporciona nuevos datos confiables para autoridades de seguridad alimentaria, partes interesadas y consumidores, se amplía el conocimiento de la contribución hecha por materias primas particulares, procesos de producción y/o máquinas a nivel general de estos metales en el producto final.

Por otra parte, Romero *et al.* (2019), utilizan un enfoque general para examinar las concentraciones de Cd, Ni y Pb en granos de cacao de nueve provincias ecuatorianas. Como resultado, el Ni fue el más abundante alcanzando concentraciones entre (1,462 - 8,528) mg/kg, seguido de Pb entre (0,502 - 1,966) mg/kg y Cd entre (0,267 - 1,715) mg/kg. Para lograr estos resultados, las muestras fueron tratadas mediante digestión ácida con HNO<sub>3</sub> asistida con microondas. Los análisis se realizaron mediante espectrofotometría de absorción atómica con dos técnicas de atomización diferentes: llama (FAAS) y horno de grafito (GFAAS). Se utilizaron lámparas de descarga sin electrodos para Cd y Pb y se utilizaron lámparas de cátodo hueco para Ni. Seis muestras de cada provincia se prepararon para ser analizadas por FAAS, y tres muestras de cada provincia se prepararon para ser analizadas por GFAAS, se utilizaron longitudes de onda específicas para cada metal: 228,80 nm, 232,00 nm y 217,00 nm para Cd, Ni y Pb, respectivamente.

Ya para el año 2020 Mohamed *et al.* validaron un método fácil y rápido basado en la técnica de digestión ácida asistida por microondas antes de la cuantificación utilizando espectrometría de masas de plasma acoplada inductivamente (ICP-MS) para el análisis de metales pesados en granos de cacao, cacao en polvo y chocolate para As, Cd, Pb Sb. Para el caso de Cd la concentración máxima en granos de cacao fue de 1,27 mg/kg, para el chocolate en polvo de 0,80 mg/kg y en el chocolate de 0,19 mg/kg.

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

## **Capítulo II.**

### **Hipótesis**

Si la técnica de absorción atómica por atomización electrotérmica en horno de grafito, permite determinar los niveles de cadmio en licores de cacao de manera precisa y exacta, con una alta sensibilidad. Se podrá proponer dicha determinación como un método de rutina para analizar o evaluar el contenido de Cd en cacao venezolano.

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

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

- Determinar el contenido de cadmio en licor de cacao mediante la técnica de espectroscopia de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS).

### **Objetivos específicos**

- Desarrollar un método analítico confiable y reproducible para la determinación de cadmio en licor de cacao.
- Estudiar y correlacionar el contenido de cadmio en grano entero seco, licor de cacao, cascarilla, cacao en polvo y grasa de muestras de cacao de distintas zonas del país.
- Evaluar la influencia de la temperatura y tiempo de tostado en el licor de cacao, sobre la disponibilidad de cadmio en muestras de cacao.

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

### **Capítulo III. Metodología**

A continuación, se describe la metodología que se utilizó para cumplir con los objetivos propuestos.

#### **Muestreo**

En el presente trabajo todas las muestras fueron proporcionadas por comercializadoras de cacao de la zona Sur del Lago de Maracaibo, de productores de cacao a nivel nacional e internacional, de centros de acopio y centrales de beneficio de cacao a nivel nacional. La toma de muestra se realizó según norma COVENIN 1339-95 donde se especifican las condiciones generales relacionadas con el muestreo de los granos de cacao tanto en sacos como a granel como se describe a continuación:

**1. Muestras primarias:** es una cantidad de granos de cacao tomados de una sola porción de lote, de acuerdo a las condiciones de las muestras primarias, debe tomarse del producto a granel o de sacos un mínimo de 100 granos por tonelada o fracción de tonelada.

**1.1. Sacos:** las muestras se tomaron al azar de por lo menos una tercera parte de los sacos de cada lote, por medio de un punzón saca muestras, de la parte superior, del centro y de la parte inferior de los sacos en buenas condiciones.

#### **Información sobre las muestras analizadas.**

En la Tabla 8 se muestra la información geográfica y el tipo de matriz de cacao analizada. Todas las muestras fueron preparadas en el LIAQIA de acuerdo a los procedimientos señalados más adelante.

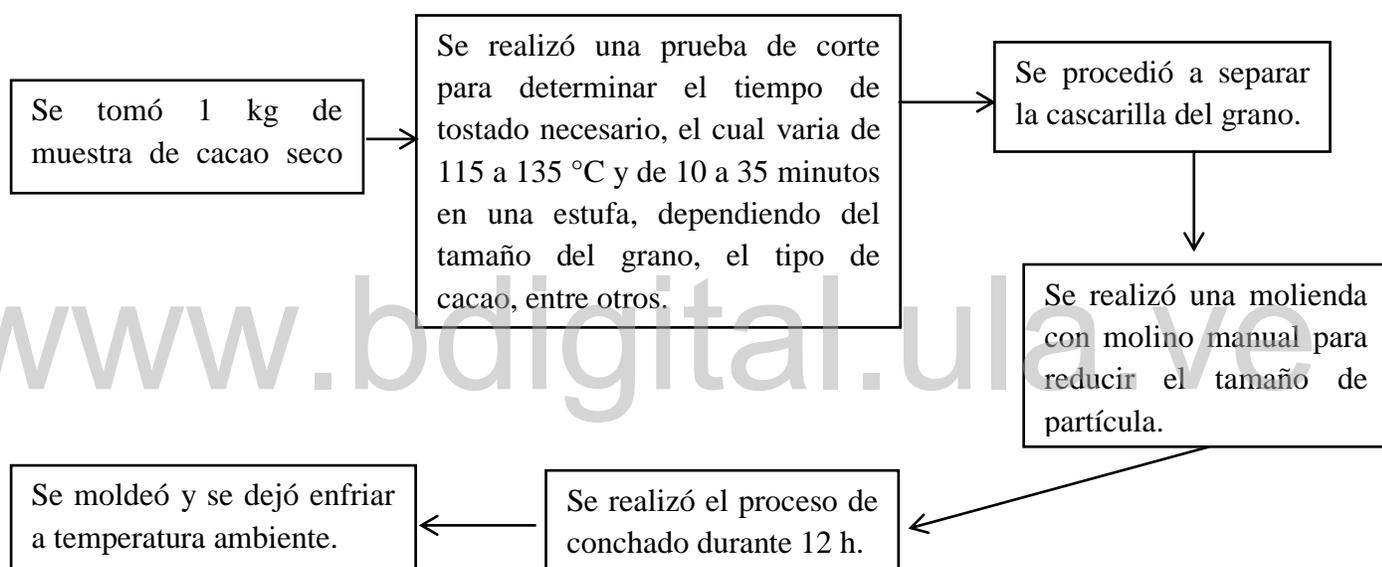
**Tabla 8. Muestras analizadas**

| <b>Código</b> | <b>Descripción</b>                            | <b>Ubicación geográfica</b>                                                                                                                        |
|---------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| M1            | Licor de cacao sin tostar                     | Brisas del Sarare, parroquia Urdaneta, distrito Alto Apure, estado Apure.                                                                          |
| M2            | Licor de cacao tostado                        | Brisas del Sarare, parroquia Urdaneta, distrito Alto Apure, estado Apure.                                                                          |
| M3            | Cascarilla M1                                 | Brisas del Sarare, parroquia Urdaneta, distrito Alto Apure, estado Apure.                                                                          |
| M4            | Cascarilla M2                                 | Brisas del Sarare, parroquia Urdaneta, distrito Alto Apure, estado Apure.                                                                          |
| M5            | Licor Cacao AGT-00418                         | Río Caribe, parroquia Río Caribe, municipio Arismendi, zona norte de la península de Paria, estado Sucre.                                          |
| M6            | Grano completo de cacao                       | Cacao de Cumboto, parroquia Ocumare de la Costa, municipio Costa de Oro, estado Aragua.                                                            |
| M7            | Cascarilla de M6                              | Cacao de Cumboto, parroquia Ocumare de la Costa, municipio Costa de Oro, estado Aragua.                                                            |
| M8            | Grano completo de cacao                       | Cacao de Cepe, parroquia Choroní, municipio Girardot, estado Aragua.                                                                               |
| M9            | Cascarilla de M8                              | Cacao de Cepe, parroquia Choroní, municipio Girardot, estado Aragua.                                                                               |
| M10           | Licor Cacao A1 Chuao                          | Cacao de Chuao, parroquia Chuao, municipio Santiago Mariño, estado Aragua.                                                                         |
| M11           | Licor Cacao A5 Canoabo                        | Cacao de Canoabo, parroquia Canoabo, municipio Bejuma, estado Carabobo.                                                                            |
| M12           | Licor de cacao Loma Larga Baja                | San Francisco de Loma Baja. Distrito de San Miguel de El Faique provincia de Huancabamba ubicada en el departamento de Piura en el norte del Perú. |
| M13           | Licor de cacao Loma Larga Alta                | San Francisco de Loma Alta. Distrito de San Miguel de El Faique provincia de Huancabamba, departamento de Piura en el Norte del Perú.              |
| M14           | Licor de cacao Bigotes                        | Distrito de San Juan de Bigote, provincia de Morropón, ubicada en el departamento de Piura, Perú.                                                  |
| M15           | Licor de cacao Caranero Superior              | Barlovento, parroquia San José de Barlovento, municipio Andrés Bello, estado Miranda.                                                              |
| M16           | Licor cacao Brisas del Sarare 120 °C x18 min  | Brisas del Sarare, parroquia Urdaneta, Distrito Alto Apure, estado Apure.                                                                          |
| M17           | Licor cacao Brisas del Sarare 118°C x20 min   | Brisas del Sarare, parroquia Urdaneta, Distrito Alto Apure, estado Apure.                                                                          |
| M18           | Licor de cacao                                | Patanemo, parroquia Patanemo, municipio Puerto Cabello, estado Carabobo.                                                                           |
| M19           | Licor de cacao San Vicente                    | San Vicente de Chucuri, provincia de Yarigués, departamento Santander, noreste de Colombia.                                                        |
| M20           | Licor cacao                                   | Cumboto, parroquia Ocumare de la Costa, municipio Costa de Oro, estado Aragua.                                                                     |
| M21           | Licor de cacao Novillero 18 min x 118 °C      | Sector Novillero, parroquia Rubio, municipio Junín, estado Táchira.                                                                                |
| M22           | Licor de cacao porcelana rojo 120 °C x 20 min | Santa Bárbara, parroquia Santa Bárbara del Zulia, municipio Colón, estado Zulia.                                                                   |
| M23           | Licor de cacao sin tostar Porvenir            | Vereda Pan de Azúcar, municipio El Zulia, Departamento Norte de Santander, Cúcuta Colombia.                                                        |
| M24           | Licor de cacao Sur del Lago A                 | Zona comercial Tucaní, parroquia Tucaní, municipio Caracciolo Parra y Olmedo, estado Mérida.                                                       |
| M25           | Licor de cacao Sur del Lago 1/4               | Zona comercial Tucaní, parroquia Tucaní, municipio Caracciolo Parra Olmedo, estado Mérida.                                                         |
| M26           | Licor de cacao                                | Brisas del Sarare, parroquia Urdaneta, distrito Alto Apure, estado Apure.                                                                          |
| M27           | Licor de cacao                                | Brisas del Sarare, parroquia Urdaneta, distrito Alto Apure, estado Apure.                                                                          |

|     |                             |                                                                           |
|-----|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| M28 | Licor de cacao              | Brisas del Sarare, parroquia Urdaneta, distrito Alto Apure, estado Apure. |
| M29 | Licor cacao sin tostar      | Brisas del Sarare, parroquia Urdaneta, distrito Alto Apure, estado Apure. |
| M30 | Licor cacao 50 °C x 40 min  | Brisas del Sarare, parroquia Urdaneta, distrito Alto Apure, estado Apure. |
| M31 | Licor cacao 50 °C x 60 min  | Brisas del Sarare, parroquia Urdaneta, distrito Alto Apure, estado Apure. |
| M32 | Licor cacao 70 °C x 40 min  | Brisas del Sarare, parroquia Urdaneta, distrito Alto Apure, estado Apure. |
| M33 | Licor cacao 125 °C x 25 min | Brisas del Sarare, parroquia Urdaneta, distrito Alto Apure, estado Apure. |

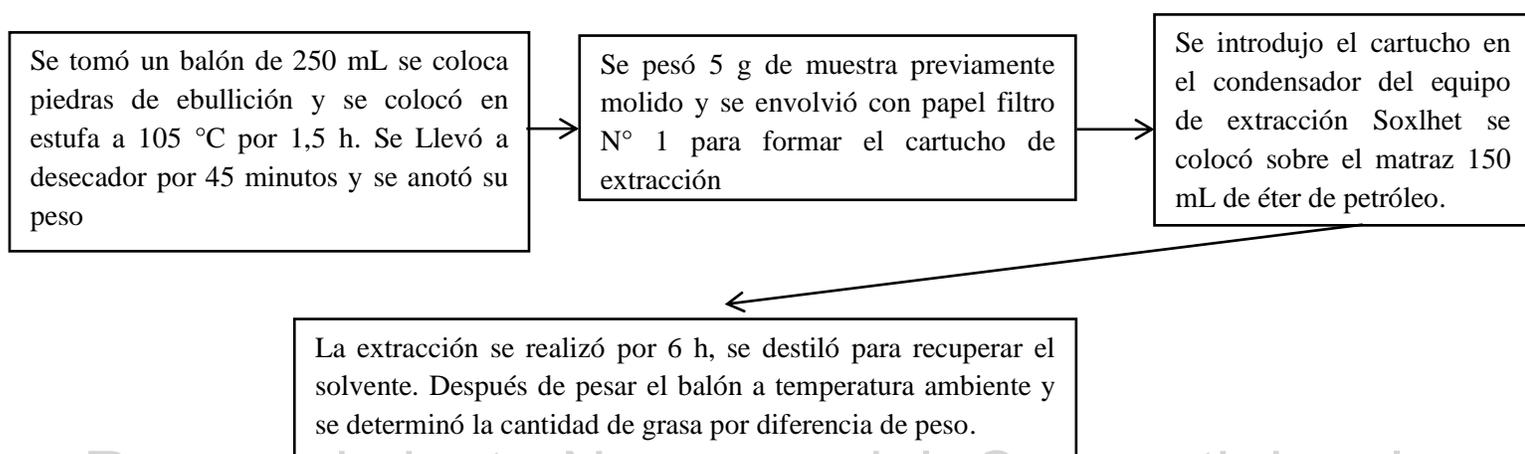
### Procedimiento para la preparación del licor de cacao

Se realizó siguiendo la metodología desarrollada en el LIAQIA la cual consiste en:



### Procedimiento para la extracción de grasa

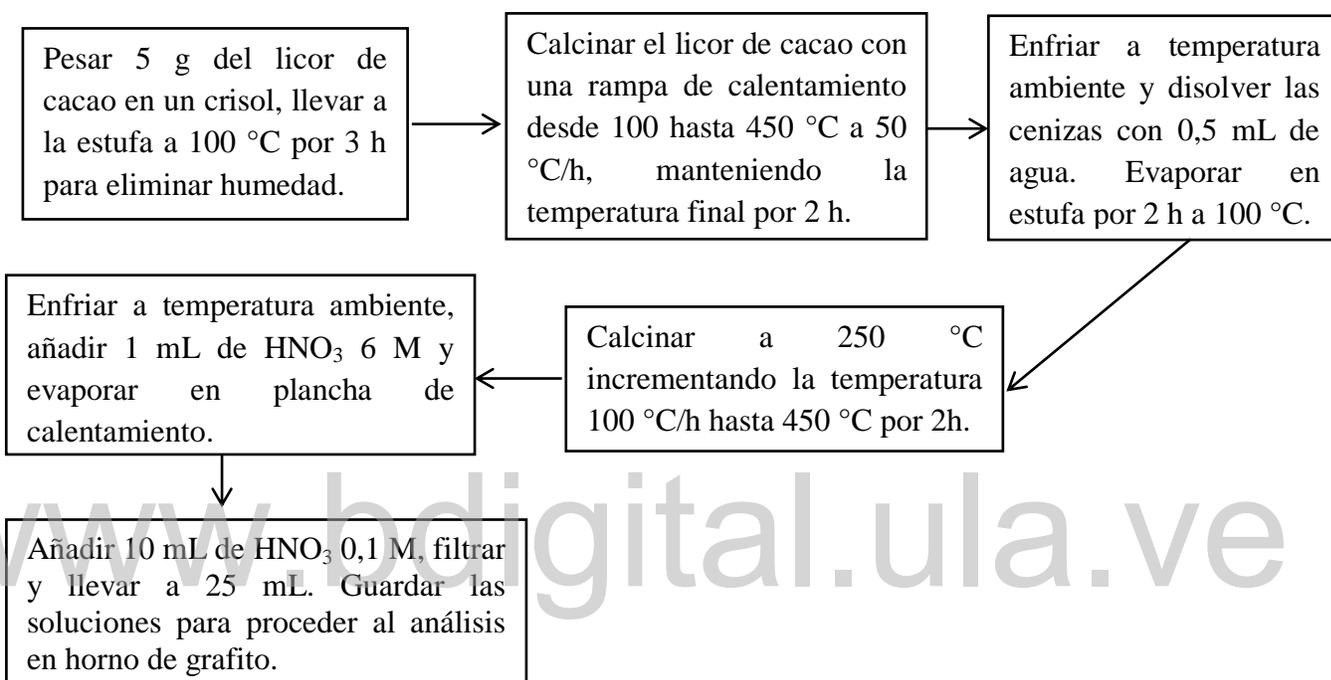
Se realizó siguiendo la metodología según norma COVENIN (1340:1995), el cual se basa en la extracción de grasa en cacao y sus sub-productos, utilizando éter de petróleo como solvente en un equipo de extracción Soxhlet.



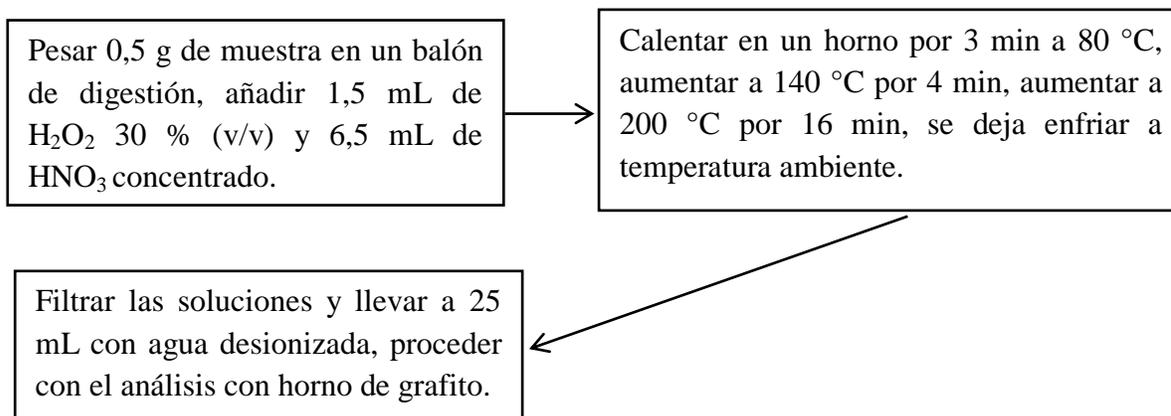
### Tratamiento de la muestra

Siguiendo el método oficial de la Association of Official Analytical Chemists (AOAC) 999.11, aplicable para la determinación de Pb, Cd, Zn, Cu y Fe, en alimentos, mediante una digestión seca y analizadas por espectroscopia de absorción atómica en llama y/o horno de grafito.

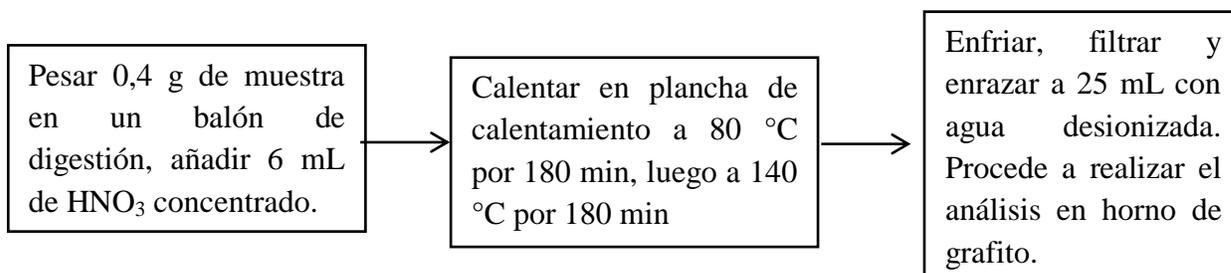
A continuación, se describe el procedimiento utilizado para el análisis.



Del mismo modo, se evaluaron otros métodos para el tratamiento de la muestra, tal es el caso del método propuesto por Villa *et al.* (2014) en el que se realiza una digestión ácida con HNO<sub>3</sub> con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, modificando la digestión asistida con microondas, por tratamiento en plancha de calentamiento, de acuerdo al siguiente procedimiento:



Otro de los métodos evaluados fue el propuesto por Chávez *et al.* (2015). El cual consiste en realizar una digestión ácida en plancha de calentamiento, tal como se describe a continuación:



### **Parámetros a optimizar en la presente investigación**

Para el tratamiento de la muestra se optimizaron los siguientes parámetros:

- Cantidad de muestra
- Temperatura de digestión
- Tiempos de digestión
- Volumen de HNO<sub>3</sub> y su concentración
- Volumen de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

En el equipo de absorción atómica se optimizaron los siguientes parámetros:

- Tipo de modificador a utilizar para la matriz bajo estudio.
- Volumen de modificador.
- Temperatura de atomización.
- Temperatura de pirólisis.

## Capítulo IV.

### Resultados y discusión de resultados

A continuación, se presentan los resultados experimentales, la optimización de los parámetros instrumentales y el tratamiento de la muestra.

#### Parámetros de funcionamiento del espectrómetro de absorción atómica con atomización electrotérmica.

A continuación, se presentan los parámetros instrumentales que se mantuvieron constantes a lo largo de todos los experimentos por recomendación del fabricante para análisis de Cd (Tabla 9).

**Tabla 9. Parámetros instrumentales del ETAAS**

| <b>Espectrómetro de absorción atómica</b> | <b>Perkin Elmer AAnalyst 600</b>                                                                                       |
|-------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Sistema de corrección de fondo            | Corrección de fondo Zeeman, campo magnético calentamiento longitudinal con horno de grafito calentado transversalmente |
| Fuente                                    | Lámpara de cátodo hueco                                                                                                |
| Corriente de la lámpara                   | 7 mA                                                                                                                   |
| Volumen de inyección de muestra           | 20 $\mu$ L                                                                                                             |
| Modo de medida                            | Área de pico                                                                                                           |
| Longitud de onda del para el Cd           | 228,8 nm                                                                                                               |

La optimización de los parámetros instrumentales se llevó a cabo partiendo del programa de calentamiento del horno de grafito recomendado por el fabricante, presentado en la Tabla 10.

**Tabla 10. Programa de calentamiento del horno de grafito recomendado por el fabricante. Tomado de (Perkin Elmer, 2003).**

| <b>Paso</b> | <b>Temperatura (°C)</b> | <b>Tiempo de rampa (s)</b> | <b>Tiempo de espera (s)</b> | <b>Flujo de gas (mL/min)</b> |
|-------------|-------------------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Secado      | 110                     | 1                          | 30                          | 250                          |
| Secado      | 130                     | 15                         | 30                          | 250                          |
| Pirolisis   | 500                     | 10                         | 30                          | 250                          |
| Atomización | 1500                    | 0                          | 5                           | 0                            |
| Limpieza    | 2450                    | 1                          | 3                           | 250                          |

#### Selección del modificador de matriz

Esta etapa, se llevó a cabo mediante el uso de distintos modificadores químicos usando como referencia el estudio realizado por Villa *et al.* (2014). Se utilizó un patrón de 2 ppb de Cd para realizar las medidas. En la Tabla 11 se muestran los modificadores de matriz utilizados.

**Tabla 11. Modificadores de matriz en estudio.**

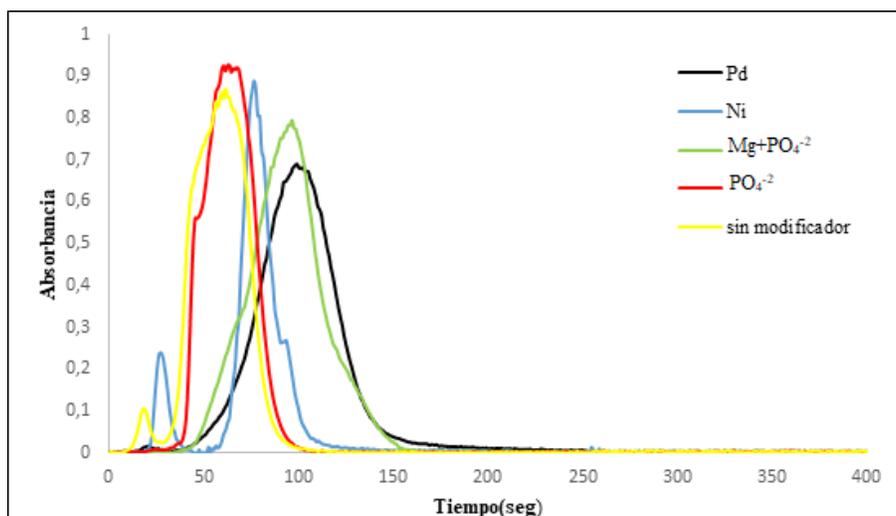
| Modificador                                                   | Masa inyectada<br>( $\mu\text{g}$ ) | Volumen inyección<br>( $\mu\text{L}$ ) |
|---------------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------|
| Pd                                                            | 10                                  | 10                                     |
| Ni                                                            | 10                                  | 10                                     |
| $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 + \text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ | 25 + 3                              | 5 + 5                                  |
| $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$                            | 20                                  | 10                                     |
| Sin modificador                                               | -                                   | 20                                     |

Los análisis se realizaron por triplicado para cada modificador. Para la evaluación se consideró la sensibilidad del método y el cálculo de coeficiente de variación (CV), tal como se muestran los resultados en la Tabla 12, a fin de determinar el modificador que mejor se adaptara al estudio propuesto.

**Tabla 12. Resultados de modificadores de matriz a  $T_{\text{pirólisis}} = 500\text{ }^\circ\text{C}$  y  $T_{\text{atomización}} = 1.500\text{ }^\circ\text{C}$ .**

| Modificador                                                   | Absorbancia | CV     |
|---------------------------------------------------------------|-------------|--------|
| Pd                                                            | 0,6916      | 0,4054 |
| Ni                                                            | 0,4661      | 1,3654 |
| $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 + \text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ | 0,7357      | 3,0173 |
| $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$                            | 0,6132      | 0,6308 |
| Sin modificador                                               | 0,6404      | 2,4025 |

En la Figura 15 se muestran las absorbancias en función al tiempo de cada uno de los modificadores que se estudiaron para evaluar y definir el modificador de matriz para los análisis posteriores. Como se aprecia la mejor señal, se obtiene con el uso de paladio como modificador. Resultados similares obtiene Burguera *et al.* (1997), al señalar que el paladio estabiliza térmicamente a los analitos permitiendo mayores temperaturas de calcinación y en algunos casos aumenta su sensibilidad.

**Figura 15. Efecto de los modificadores en los perfiles de absorbancias del Cd**

Al observar la Tabla 11 los coeficientes de variación más bajos corresponden a los modificadores de Pd y  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ . Sin embargo, como se evidencia en la Figura 15 el  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  a pesar de obtener una altura de pico mayor con respecto al Pd, la curva de absorción del Pd es más simétrica, permitiendo un área de pico mucho más amplia, lo cual minimiza el error y representa mayor absorbancia del analito atomizado. Esto se ve reflejado en la estabilidad térmicamente del analito a temperaturas de atomización más altas. Por esta razón, el Pd fue seleccionado como modificador de matriz para los experimentos siguientes.

### Optimización de la temperatura de pirólisis y atomización

Con el fin de evaluar el efecto que tiene el uso del modificador de Pd (10  $\mu\text{g}$ ) sobre la señal de Cd en el horno de grafito, se optimizaron las temperaturas de pirólisis y atomización para una solución de 2 ppb de Cd en presencia del modificador. Para observar el efecto de matriz de la muestra sobre la señal de Cd, se optimizaron las temperaturas de pirólisis y atomización con una muestra de licor de cacao en presencia del modificador de Pd, fortificada con 1,91 ppb de Cd. La temperatura de pirólisis se estudió desde 300 °C hasta 800 °C, manteniendo la temperatura de atomización fija en 1.500 °C (valor recomendado por el fabricante para análisis de Cd (Perkin Elmer, 2003). Luego se optimizó la temperatura de atomización variando la misma desde 1.300 °C hasta 1.700 °C, manteniendo la temperatura de pirólisis fija en el valor optimizado. A continuación, se presentan las curvas de pirólisis y atomización de las soluciones estudiadas.

### Patrón de 2 ppb de Cd

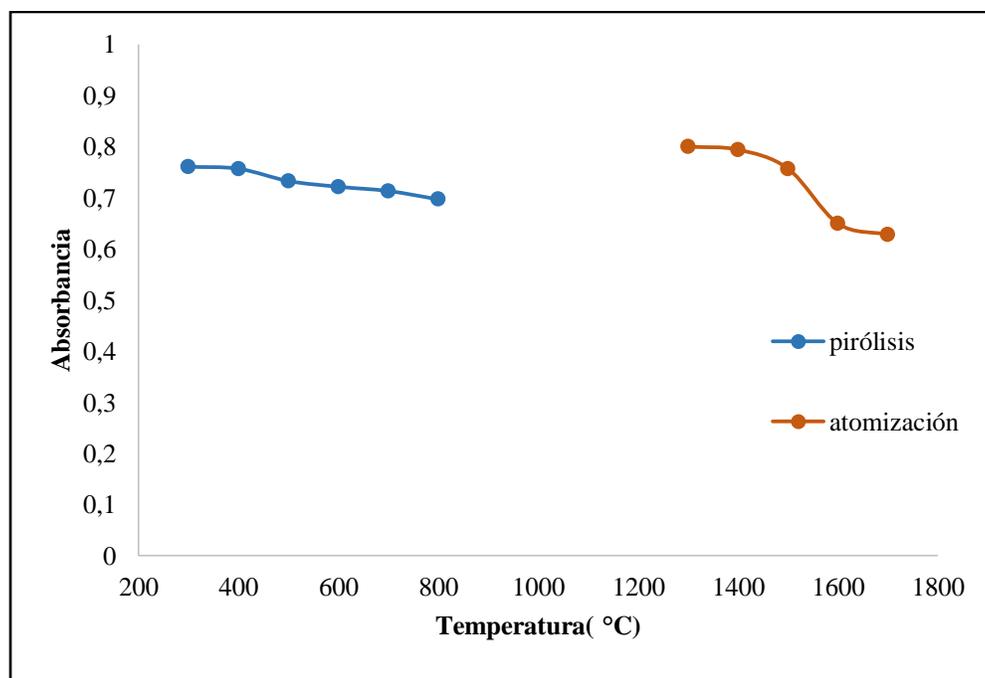
En las Tablas 13 y 14 se presentan los resultados de las curvas de pirólisis y atomización para el patrón de 2 ppb de Cd. En la Figura 16 se muestran las curvas de pirólisis y atomización para dicha solución.

**Tabla 13. Temperatura de pirólisis para el patrón de 2 ppb de Cd con  $T_{\text{atomización}} = 1.500$  °C**

| $T_{\text{pirólisis}}$ (°C) | Absorbancia | CV   |
|-----------------------------|-------------|------|
| 300                         | 0,7608      | 0,64 |
| 400                         | 0,7570      | 0,35 |
| 500                         | 0,7329      | 0,78 |
| 600                         | 0,7217      | 1,22 |
| 700                         | 0,7134      | 1,96 |
| 800                         | 0,6971      | 2,64 |

**Tabla 14. Temperatura de atomización para patrón de 2 ppb de Cd con  $T_{\text{pirólisis}} = 400$  °C**

| $T_{\text{atomización}}$ (°C) | Absorbancia | CV   |
|-------------------------------|-------------|------|
| 1.300                         | 0,8001      | 0,91 |
| 1.400                         | 0,7942      | 1,13 |
| 1.500                         | 0,757       | 1,78 |
| 1.600                         | 0,6497      | 2,33 |
| 1.700                         | 0,6281      | 3,71 |



**Figura 16. Curvas de pirólisis y atomización para un patrón de Cd de 2 ppb.**

Al observar las curvas de pirólisis y atomización para un patrón de 2 ppb de Cd la señal de Cd es relativamente constante hasta los 400 °C. Luego de esta temperatura, la señal del analito decae perdiendo sensibilidad. Por otra parte, se observa un aumento del coeficiente de variación (CV) a temperaturas de pirólisis mayores a 400 °C (Tabla 13). Este efecto se debe a que, durante la pirólisis, la señal es irreproducible como consecuencia de la pérdida del analito. Por esta razón, la temperatura óptima de pirólisis es de 400 °C, pues es la máxima temperatura donde no se produce pérdida del analito y la señal es reproducible.

Una vez determinada la temperatura óptima de pirólisis, se utilizó la misma para estudiar el efecto de la temperatura de atomización sobre la señal del Cd. Al observar la Figura 16 se ve que la señal del analito se mantiene relativamente constante hasta 1400 °C, al aumentar la temperatura de atomización disminuye la señal, esto se debe al aumento de la velocidad con la que se pierden los átomos libres del analito por difusión y por expansión de los gases calientes. Esto explica por qué la señal cae después de los 1400 °C, ya que a temperaturas mayores los átomos se pierden más rápidamente de lo que se producen. Por esta razón, la temperatura de atomización óptima establecida fue de 1400 °C, ya que es la menor temperatura que produce la mejor señal. Además, al utilizar temperaturas de atomización bajas se deteriora menos el tubo de grafito prolongándose así su vida útil.

#### **Muestra de licor de cacao con Pd como modificador**

En las Tablas 15 y 16 se presentan los resultados de las curvas de pirólisis y atomización para una muestra de licor de cacao tostado. En la Figura 17 se presentan las curvas de pirólisis y atomización.

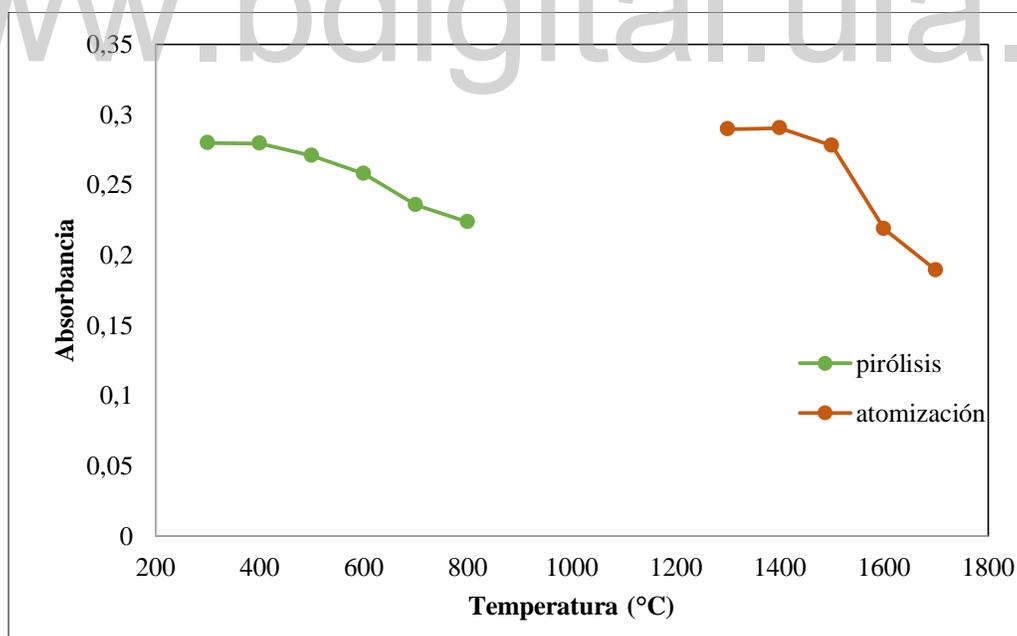
**Tabla 15. Temperatura de pirólisis para muestra de licor de cacao tostado con  $T_{\text{atomización}} = 1.500\text{ }^{\circ}\text{C}$**

| $T_{\text{pirólisis}}\text{ (}^{\circ}\text{C)}$ | Absorbancia | CV   |
|--------------------------------------------------|-------------|------|
| 300                                              | 0,2799      | 1,15 |
| 400                                              | 0,2794      | 0,52 |
| 500                                              | 0,2705      | 0,90 |
| 600                                              | 0,2578      | 0,66 |
| 700                                              | 0,2356      | 1,98 |
| 800                                              | 0,2234      | 2,73 |

**Tabla 16. Temperatura de atomización para muestra de licor de cacao con  $T_{\text{pirólisis}} = 400\text{ }^{\circ}\text{C}$**

| $T_{\text{atomización}}\text{ (}^{\circ}\text{C)}$ | Absorbancia | CV   |
|----------------------------------------------------|-------------|------|
| 1300                                               | 0,2815      | 1,12 |
| 1400                                               | 0,2803      | 1,16 |
| 1500                                               | 0,2779      | 1,17 |
| 1600                                               | 0,2187      | 1,59 |
| 1700                                               | 0,189       | 2,83 |

En las curvas de pirólisis y atomización de la muestra de licor de cacao tostado (Figura 17), se visualiza un comportamiento muy similar al del patrón de Cd de 2 ppb (Figura 16), donde la temperatura de pirólisis en ambos casos se mantiene constante hasta  $400\text{ }^{\circ}\text{C}$ , luego de esa temperatura comienza a decaer la señal del analito, debido a la pérdida del mismo.



**Figura 17. Curvas de pirólisis y atomización para una muestra de licor de cacao tostado.**

Para la temperatura de atomización se observa un comportamiento similar tanto para la muestra como para el patrón de cadmio, la temperatura se mantiene constante hasta los  $1.400\text{ }^{\circ}\text{C}$  donde se alcanza la máxima señal de Cd presente en la muestra.

### Muestra de licor de cacao fortificada con 1,91 ppb de Cd.

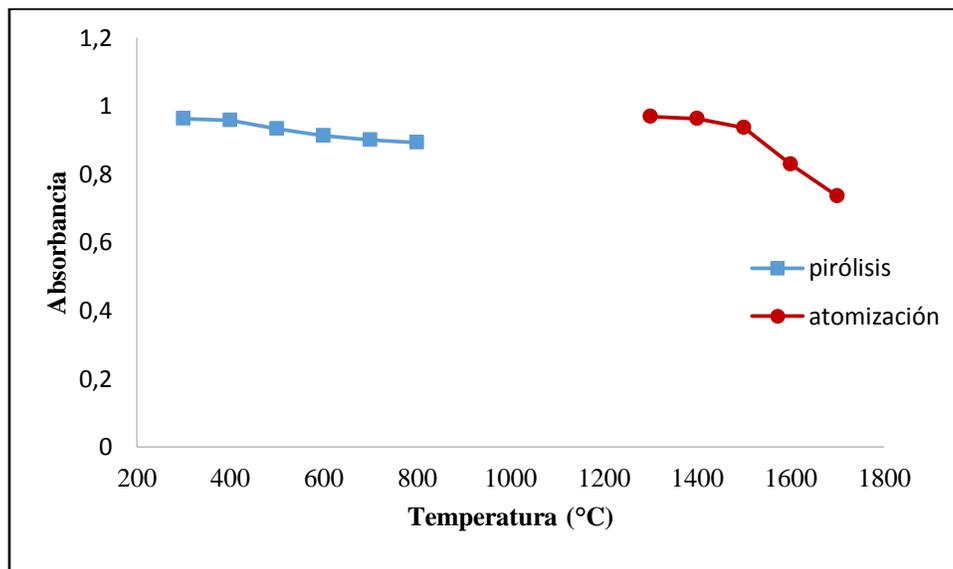
Seguidamente, se evaluó el efecto de la temperatura de pirólisis y atomización para una muestra de licor de cacao fortificado con una concentración conocida de cadmio. En las Tablas 17 y 18 se presentan los resultados de las curvas de pirólisis y atomización para la muestra de licor de cacao fortificada con 1,91 ppb de Cd. En la Figura 18 se muestran las curvas para este estudio.

**Tabla 17. Temperatura de pirólisis para muestra de licor de cacao tostado fortificado con 1,91 ppb de Cd con  $T_{\text{atomización}} = 1.500\text{ }^{\circ}\text{C}$**

| $T_{\text{pirólisis}}\text{ (}^{\circ}\text{C)}$ | Absorbancia | CV   |
|--------------------------------------------------|-------------|------|
| 300                                              | 0,9621      | 0,09 |
| 400                                              | 0,9576      | 0,04 |
| 500                                              | 0,9327      | 0,40 |
| 600                                              | 0,9117      | 1,13 |
| 700                                              | 0,9003      | 0,93 |
| 800                                              | 0,8912      | 0,94 |

**Tabla 18. Temperatura de atomización para muestra de licor de cacao tostado fortificado con 1,91 ppb de Cd con  $T_{\text{pirólisis}} = 400\text{ }^{\circ}\text{C}$**

| $T_{\text{atomización}}\text{ (}^{\circ}\text{C)}$ | Absorbancia | CV   |
|----------------------------------------------------|-------------|------|
| 1300                                               | 0,9681      | 0,56 |
| 1400                                               | 0,9617      | 0,14 |
| 1500                                               | 0,9358      | 0,65 |
| 1600                                               | 0,8276      | 5,03 |
| 1700                                               | 0,7345      | 3,10 |



**Figura 18. Curvas de pirólisis y atomización para una muestra de licor de cacao tostado fortificado con 1,91 ppb de Cd.**

Al comparar la Figura 19 con las Figuras 16 a 18, la temperatura óptima para la matriz en estudio es de 400 °C, temperatura en la cual se alcanza la mayor señal sin pérdida del analito que produzca una atenuación de la misma, además, a esta temperatura la energía es suficiente para descomponer la matriz bajo estudio.

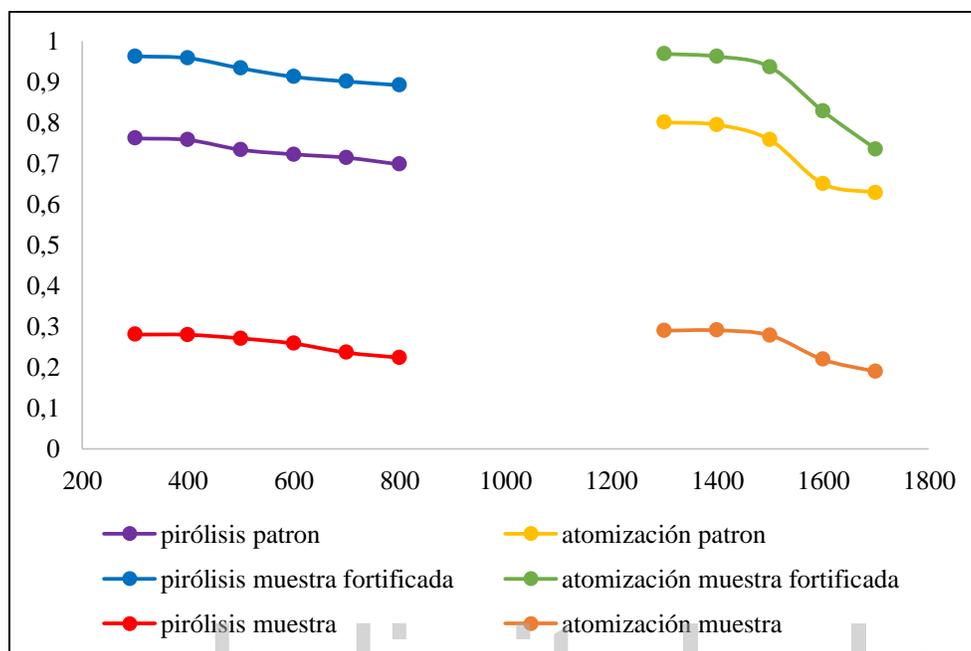


Figura 19. Curvas de pirólisis y atomización para Cd en distintas matrices.

Con respecto a la temperatura de atomización, en la Figura 19 se observa que la temperatura de atomización no cambia con respecto al patrón, la muestra y la muestra fortificada. Se seleccionó una temperatura óptima de 1.400 °C, la cual como se señaló anteriormente, es la temperatura más baja que produce la mayor señal, poniendo en evidencia que, a temperaturas mayores a esta, la pérdida del analito es mayor en todas las muestras antes estudiadas.

Con base en las pruebas realizadas se modificaron algunos parámetros analíticos para optimizar el método, los cuales se presentan en la Tabla 19.

Tabla 19. Programa de calentamiento optimizado.

| Paso        | Temperatura (°C) | Tiempo de rampa (s) | Tiempo de espera (s) | Flujo de gas (mL/min) |
|-------------|------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|
| Secado      | 110              | 1                   | 30                   | 250                   |
| Secado      | 130              | 15                  | 30                   | 250                   |
| Pirólisis   | 400              | 10                  | 30                   | 250                   |
| Atomización | 1400             | 0                   | 5                    | 0                     |
| Limpieza    | 2450             | 1                   | 3                    | 250                   |

Con el programa de calentamiento de la Tabla 19 se procedió optimizar el tratamiento de la muestra y la metodología a utilizar.

### Curva de calibración

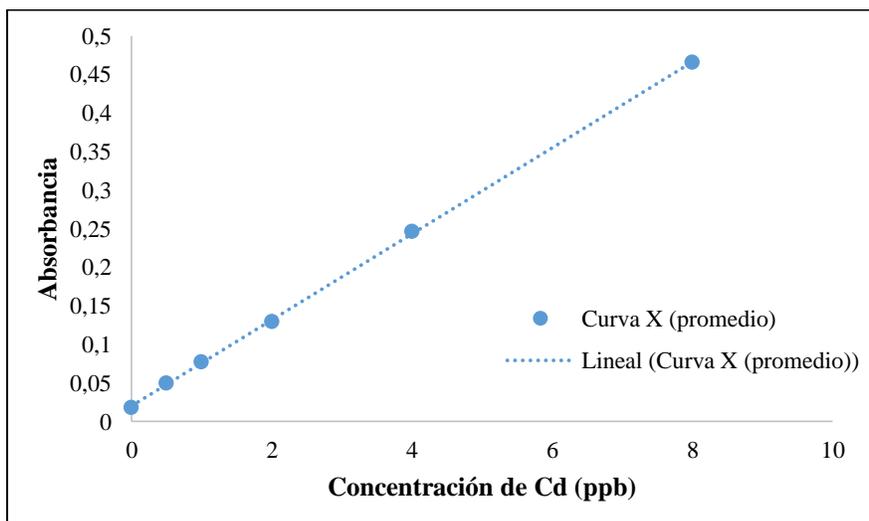
Se prepararon una serie de soluciones de diferentes concentraciones desde 0 a 8 ppb de Cd a partir de un patrón de Cd de 1000 ppm. Se analizaron cinco curvas de calibración para evaluar el coeficiente de variación de las medidas y tener el sistema bajo control estadístico, tres de ellas se prepararon y midieron de forma aleatoria (C, D y E), una en forma ascendente (A) y otra en forma descendente (B). En la Tabla 20 se muestran las curvas de calibración obtenidas en esta investigación.

**Tabla 20. Curvas de calibración analizadas.**

| [Cd] ppb | Curva A        | Curva B        | Curva C        | Curva D        | Curva E        | X                       | SD     | CV   |
|----------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------------------------|--------|------|
| 0        | 0,0178         | 0,0176         | 0,018          | 0,0176         | 0,0178         | 0,0178                  | 0,0002 | 0,94 |
| 0,5      | 0,0493         | 0,0497         | 0,05           | 0,0498         | 0,0495         | 0,0497                  | 0,0003 | 0,54 |
| 1        | 0,0757         | 0,0773         | 0,0767         | 0,0777         | 0,0767         | 0,0768                  | 0,0008 | 0,98 |
| 2        | 0,128          | 0,1291         | 0,1301         | 0,1294         | 0,1293         | 0,1292                  | 0,0008 | 0,59 |
| 4        | 0,2432         | 0,2461         | 0,2489         | 0,2467         | 0,2469         | 0,2464                  | 0,0021 | 0,83 |
| 8        | 0,462          | 0,4626         | 0,4687         | 0,4654         | 0,4627         | 0,4643                  | 0,0028 | 0,60 |
|          | $R^2 = 0,9999$ | $R^2 = 0,9998$ | $R^2 = 0,9998$ | $R^2 = 0,9998$ | $R^2 = 0,9997$ | Promedio $R^2 = 0,9998$ |        |      |
|          | $m = 0,0554$   | $m = 0,0555$   | $m = 0,0563$   | $m = 0,0558$   | $m = 0,0555$   | Promedio $m = 0,0557$   |        |      |
|          | $b = 0,0196$   | $b = 0,0204$   | $b = 0,0201$   | $b = 0,0203$   | $b = 0,0204$   | Promedio $b = 0,0202$   |        |      |

En la Tabla 20 se observa que el  $CV < 2\%$ , esto indica que se encuentra dentro del rango de error permitido y recomendado internacionalmente (Fernández *et al.*, 2001), indicando que la curva de calibración se encuentra bajo control estadístico. Adicionalmente, se realizó un tratamiento estadístico mediante análisis de varianza (ANOVA) aplicada a los datos de la pendiente para determinar la existencia de diferencias significativas, se aplicó la prueba de Tukey ( $p = 0,05$ ) obteniendo como resultado ( $p > 0,05$ ) indicando que no existe diferencias significativas entre las pendientes de las curvas de calibración. Para ello se utilizó en software Minitab 16, como herramienta estadística descriptiva.

En la Figura 20 se presenta la curva de calibración del promedio de las curvas bajo estudio descritas en la Tabla 20.



**Figura 20. Curva de calibración del promedio de las curvas de calibración.**

### Optimización de la metodología a utilizar

Con la curva de calibración bajo control estadístico se procedió a poner a prueba la técnica a utilizar, primero se evaluó la metodología sugerida por Chávez *et al.* (2015), se realizó una digestión ácida a una muestra de licor de cacao con HNO<sub>3</sub> concentrado, utilizando balones de digestión en plancha de calentamiento, cada ensayo se realizó por duplicado, variando la masa de muestra, así como el volumen de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizado, de manera de medir la eficiencia de la digestión. En la Tabla 21 se muestra los resultados de esta experiencia.

**Tabla 21. Digestión con HNO<sub>3</sub> concentrado a 83 °C durante cuatro horas.**

| Solución | Masa de la muestra (g) | V HNO <sub>3</sub> (mL) | V H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mL) | [Cd] mg/kg | CV    |
|----------|------------------------|-------------------------|--------------------------------------|------------|-------|
| A        | 0,5055                 | 5                       | -                                    | 0,0162     | 12,35 |
| B        | 0,5002                 | 5                       | -                                    | 0,0193     |       |
| C        | 1,0019                 | 5                       | -                                    | 0,0158     | 5,59  |
| D        | 1,0049                 | 5                       | -                                    | 0,0171     |       |
| E        | 0,501                  | 5                       | 1,5                                  | 0,0155     | 9,77  |
| F        | 0,5008                 | 5                       | 1,5                                  | 0,0178     |       |
| G        | 0,5002                 | 2,5                     | -                                    | 0,0167     | 5,69  |
| H        | 0,5008                 | 2,5                     | -                                    | 0,0181     |       |
| I        | 0,5004                 | 2,5                     | 0,5                                  | 0,0114     | 6,51  |
| J        | 0,5016                 | 2,5                     | 0,5                                  | 0,0125     |       |

Al observar los resultados de la Tabla 21, se tiene que no hay concordancia en los resultados obtenidos ya que al comparar las soluciones A y B con las soluciones C y D las concentraciones obtenidas son similares. Este resultado no es de esperarse, debido que las soluciones C y D tienen el doble de masa de las muestras que las soluciones A y B por lo que se esperaría que la concentración debería ser el doble. Del mismo modo ocurre al comparar las concentraciones obtenidas en las soluciones I y J, con las soluciones C y D que de igual modo tienen el doble de masa de muestra.

Por otra parte, al observar los CV de cada experiencia, todos son > 2 % lo que indica que estos resultados son poco precisos pues existe poca reproducibilidad y dispersión en los mismos (Fernández *et al.*, 2001). De igual modo al realizar la prueba de Tukey ( $p = 0,05$ ) mediante ANOVA, se obtuvo ( $p < 0,05$ ) lo que indica que existe diferencias significativas en los resultados obtenidos por la utilización del método (Miller y Miller, 2002).

Dado los resultados anteriores, se evaluó el método sugerido por Villa *et al.* (2014), donde se realizó una digestión ácida con HNO<sub>3</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 150 °C utilizando un equipo Kjeldahl. Cada ensayo se realizó por duplicado, manteniendo constante la masa de muestra, variando el volumen de HNO<sub>3</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 156 minutos. A continuación, en la Tabla 22 se muestran los resultados.

**Tabla 22. Digestión en equipo de Kjeldahl**

| Solución | Masa muestra(g) | V (mL) HNO <sub>3</sub> | V (mL) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | [Cd] mg/kg | CV    |
|----------|-----------------|-------------------------|--------------------------------------|------------|-------|
| 1        | 0,5001          | 5                       | -                                    | 0,0223     | 47,14 |
| 2        | 0,5019          | 5                       | -                                    | 0,0446     |       |
| 4        | 0,5012          | 5                       | 1,5                                  | 0,0101     | 38,66 |
| 5        | 0,5002          | 5                       | 1,5                                  | 0,0177     |       |
| 7        | 0,5004          | 2,5                     | -                                    | 0,0461     | 22,02 |
| 8        | 0,5002          | 2,5                     | -                                    | 0,0631     |       |
| 10       | 0,5014          | 2,5                     | 0,5                                  | 0,0311     | 17,35 |
| 11       | 0,5030          | 2,5                     | 0,5                                  | 0,0398     |       |

Como se observa en la Tabla 22 los CV son mucho mayor al 2 %, que es el criterio de aceptación para métodos instrumentales (Fernández *et al.*, 2001), de igual modo, al realizar el análisis estadístico ANOVA se obtuvo ( $p < 0,05$ ) demostrando que existe diferencias significativas debido a que los resultados presentan mucha dispersión y no proporcionan reproducibilidad en el análisis (Miller y Miller, 2002).

Debido a que en ninguno de los métodos anteriores se obtuvo resultados satisfactorios ya que presentan diferencias significativas en sus resultados al tener ( $p < 0,05$ ). Además, al ser los CV muy elevados indica poca reproducibilidad, por estas razones, se procedió a evaluar la metodología oficial de la Association of Official Analytical Chemists (AOAC) 999.11 (2005), para este ensayo se realizaron las mediciones por quintuplicado. Los resultados de esta experiencia se muestran en la Tabla 23.

**Tabla 23. Evaluación del contenido de Cd con el método de la (AOAC) 999.11 (2005).**

| Solución | Masa de la muestra (g) | Vf (mL) | [Cd] mg/kg | CV   |
|----------|------------------------|---------|------------|------|
| 1        | 5,0242                 | 25      | 0,2236     | 1,31 |
| 2        | 5,0002                 | 25      | 0,2255     |      |
| 3        | 5,0095                 | 25      | 0,2178     |      |
| 4        | 5,0085                 | 25      | 0,2211     |      |
| 5        | 5,0218                 | 25      | 0,2226     |      |

Al realizar el análisis estadístico para este método se obtuvo ( $p > 0,05$ ) indicando que no existe diferencias significativas en los resultados obtenidos.

Comparando los resultados de las Tablas 21; 22 y 23 con análisis estadístico se obtuvo un ( $p < 0,05$ ), lo que indica que existen diferencias significativas entre los tres métodos. No obstante, se observa que el método de la (AOAC) 999.11 (2005) es el único cuyo valor de CV se encuentra por debajo del criterio de aceptación internacionalmente ( $< 2 \%$ ), lo que indica mayor reproducibilidad, es por esta razón que se descarta por completo las metodologías propuestas por Chávez *et al.* (2015) y Villa *et al.* (2014) debido a que los resultados indican que no hay reproducibilidad ni precisión en el método debido a los CV elevados.

Con la metodología ya definida se procedió a realizar estudios de interferencia y evaluar los parámetros analíticos del método.

### Estudios de interferencia

Con el fin de evaluar posibles interferencias de matriz, se realizó un estudio de adición de estándar. Para ello se prepararon curvas de adición estándar, donde a todas las soluciones de la curva se le agregó un volumen constante de muestra, luego se llevaron a cabo adiciones sucesivas de cadmio a partir de un patrón de 50 ppb. En la Tabla 24 se muestran la preparación de la curva de adición estándar.

**Tabla 24. Preparación de las curvas de adición estándar.**

| Solución | V muestra (mL) | V patrón (μL) | [Cd] mg/kg | Vf (mL) |
|----------|----------------|---------------|------------|---------|
| 1        | 2              | 0             | 0          | 5       |
| 2        | 2              | 50            | 0,5        | 5       |
| 4        | 2              | 100           | 1          | 5       |
| 5        | 2              | 200           | 2          | 5       |
| 6        | 2              | 400           | 4          | 5       |
| 7        | 2              | 800           | 8          | 5       |

Se realizó de igual manera tres curvas de calibración para evaluar la posible interferencia de matriz con la curva de adición estándar. En las Tablas 25 y 26 se muestran los resultados.

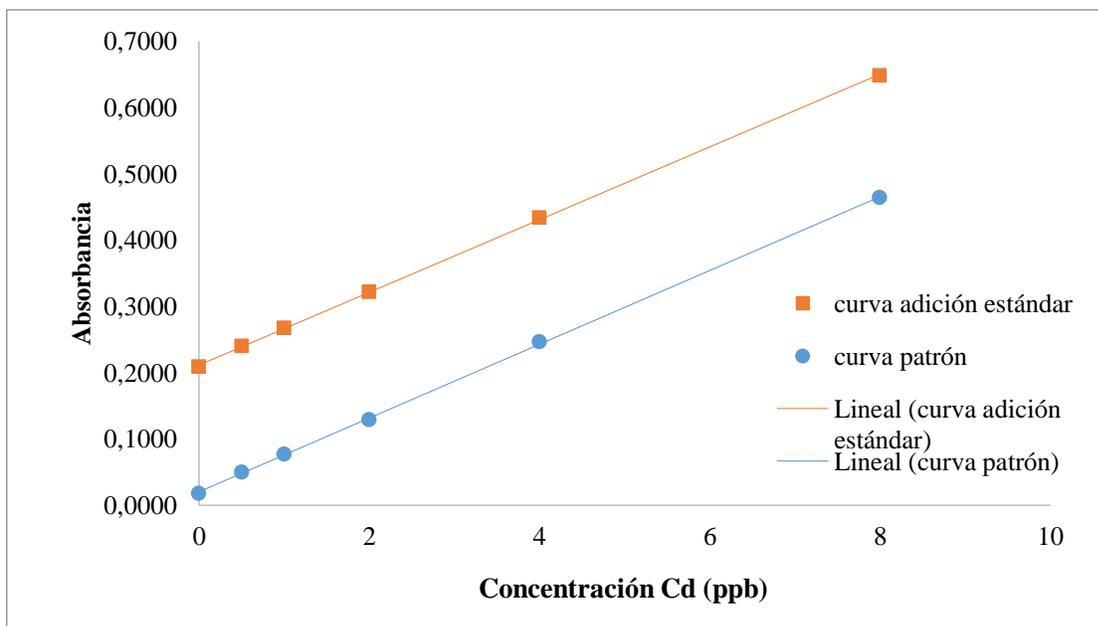
**Tabla 25. Curvas de calibración sin la adición del estándar de cadmio.**

| C patrón                                                                        | Curva A | Curva B | Curva C | X         | SD     | CV   |
|---------------------------------------------------------------------------------|---------|---------|---------|-----------|--------|------|
| 0                                                                               | 0,0178  | 0,0179  | 0,0178  | 0,0178    | 0,0001 | 0,32 |
| 0,5                                                                             | 0,0493  | 0,0497  | 0,0500  | 0,0497    | 0,0004 | 0,71 |
| 1                                                                               | 0,0759  | 0,0773  | 0,0767  | 0,0766    | 0,0007 | 0,92 |
| 2                                                                               | 0,128   | 0,1291  | 0,1301  | 0,1291    | 0,0011 | 0,81 |
| 4                                                                               | 0,2457  | 0,2462  | 0,2465  | 0,2461    | 0,0004 | 0,16 |
| 8                                                                               | 0,462   | 0,4626  | 0,4687  | 0,4644    | 0,0037 | 0,80 |
| $R^2 = (0,9998 \pm 0,0001)$ $m = (0,0557 \pm 0,0004)$ $b = (0,0200 \pm 0,0003)$ |         |         |         | CV = 0,73 |        |      |

**Tabla 26. Curvas de calibración con la adición del estándar de cadmio.**

| Curva 1                                                                         | Curva 2 | Curva 3 | X      | SD        | CV   |
|---------------------------------------------------------------------------------|---------|---------|--------|-----------|------|
| 0,2087                                                                          | 0,2086  | 0,2085  | 0,2086 | 0,0001    | 0,05 |
| 0,2400                                                                          | 0,2399  | 0,2405  | 0,2401 | 0,0003    | 0,13 |
| 0,2681                                                                          | 0,266   | 0,2688  | 0,2676 | 0,0015    | 0,54 |
| 0,3210                                                                          | 0,3214  | 0,3219  | 0,3214 | 0,0005    | 0,14 |
| 0,4339                                                                          | 0,4338  | 0,4332  | 0,4336 | 0,0004    | 0,09 |
| 0,6487                                                                          | 0,6485  | 0,6483  | 0,6485 | 0,0002    | 0,03 |
| $R^2 = (0,9998 \pm 0,0001)$ $m = (0,0548 \pm 0,0001)$ $b = (0,2118 \pm 0,0005)$ |         |         |        | CV = 0,18 |      |

En la Figura 21 se representa el promedio de las curvas elaboradas con los resultados presentados en las Tablas 25 y 26.



**Figura 21. Curvas de patrón de Cd y curva de adición estándar.**

Observando las dos rectas (Figura 21) y al realizar el análisis estadístico para comparar las pendientes de los gráficos de calibración respectivos (Tabla 25 y 26), con un ( $p > 0,05$ ) refleja que no existe diferencia significativa en las mismas. Lo cual pone en evidencia que la matriz de las muestras de cacao no interfiere en la determinación de Cd y que es posible realizar la calibración con patrones acuosos de Cd sin la aplicación de un método de adición de estándar.

### Estudios de recuperación

Para determinar la exactitud del método, se llevaron a cabo pruebas de recuperación de los patrones añadidos durante la adición estándar. Para determinar el porcentaje de recuperación de cada adición, se determinó la concentración de dicha solución despejándola de la ecuación de la curva de adición estándar (ecuación 6) como explica Beach (1988) utilizando la absorbancia experimental de cada adición estándar obtenida en la Tabla 26.

$$[\text{Cd}]_{\text{experimental}} = \frac{\text{Área de pico} - b}{m} \quad (6)$$

donde  $b$  corresponde al corte en el eje de las ordenadas de la curva de calibración y  $m$  corresponde a la pendiente de la curva de calibración. Luego el porcentaje de Recuperación se calculó por medio de la (ecuación 7) como explican Araujo *et al.* (2020) y Gonzales *et al.* (1999).

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{[\text{Cd}]_{\text{experimental}}}{C_{\text{añadida}}} * 100 \quad (7)$$

En la Tabla 27 se presenta el porcentaje de recuperación determinados de esta manera.

**Tabla 27. Estudio recuperación a partir de la curva de adición estándar.**

| <b>Solución</b> | <b>[Cd] añadida (ppb)</b> | <b>[Cd] experimental (ppb)</b> | <b>% Recuperación</b> |
|-----------------|---------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| 1               | 0,5                       | 0,5164                         | 103,3                 |
| 2               | 1                         | 1,0182                         | 101,8                 |
| 3               | 2                         | 2,0010                         | 100,4                 |
| 4               | 4                         | 4,0511                         | 101,3                 |
| 5               | 8                         | 7,9690                         | 99,6                  |

A partir de los porcentajes de recuperación individuales presentado en la Tabla 27, se determinó la recuperación global del método al promediar dichas recuperaciones (Fernández *et al.*, 2003), obteniéndose una recuperación global para el método de  $101,3 \pm 1,41$  %, el porcentaje de recuperación calculado se encuentra dentro del criterio de aceptación recomendado por la AOAC, (2016) el cual varía entre 80 y 110 %.

### Figuras analíticas de mérito

En la Tabla 28 se representan las figuras analíticas de mérito para la determinación de cadmio en cacao. Los valores del límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ), corresponde al promedio del blanco analizado y se determinaron por medio de las ecuaciones 3 y 4. La sensibilidad de la técnica corresponde a la pendiente de la curva de calibración. Como valor se reportó el promedio para las curvas obtenidas en los ensayos de estandarización y en la medición de muestras, indicando su desviación estándar.

**Tabla 28. Parámetros analíticos evaluados.**

| <b>R<sup>2</sup></b> | <b>Sensibilidad (ppb)</b> | <b>LD (ppb)</b> | <b>LQ (ppb)</b> | <b>% Recuperación</b> | <b>% RSD</b> |
|----------------------|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------------|--------------|
| $0,9998 \pm 0,0001$  | $0,0548 \pm 0,0001$       | 0,0149          | 0,0498          | $101,3 \pm 1,41$      | 1,32         |

Límite de detección (LD).

Límite de cuantificación (LQ).

### Análisis de muestras

La metodología desarrollada se aplicó para la determinación de cadmio en muestras de granos de cacao y licor de cacao. En todos los casos los análisis se realizaron por triplicado. En la Tabla 29, se presentan las concentraciones de las muestras de acuerdo al código asignado al momento de entrada al laboratorio, de acuerdo a los protocolos internos del LIAQIA.

**Tabla 29. Resultados de las muestras analizadas.**

| Código | Descripción                                                  | Concentración (mg/kg) |
|--------|--------------------------------------------------------------|-----------------------|
| M1     | Licor de cacao sin tostar (Brisas del Sarare)                | 0,1553                |
| M2     | Licor de cacao tostado (Brisas del Sarare)                   | 0,2054                |
| M5     | Licor de cacao (Río Caribe)                                  | 1,4371                |
| M6     | Grano de cacao completo (Cumboto)                            | 5,1787                |
| M8     | Grano de cacao completo (Cepe)                               | 0,4207                |
| M10    | Licor de cacao (Chua)                                        | 0,4557                |
| M11    | Licor de cacao (Canoabo)                                     | 0,1230                |
| M15    | Licor de cacao (Caranero Superior, Barlovento)               | 1,0952                |
| M16    | Licor de cacao tostado a 120 °C x 18 min (Brisas del Sarare) | 2,8670                |
| M17    | Licor de cacao tostado a 118 °C x 20 min (Brisas del Sarare) | 3,0673                |
| M18    | Licor de cacao (Patanemo)                                    | 0,1225                |
| M20    | Licor de cacao (Cumboto)                                     | 0,1347                |
| M21    | Licor de cacao Novillero tostado a 18 min x 118 °C           | 0,2332                |
| M22    | Licor de cacao Porcelana rojo tostado a 120 °C x 20 min      | 0,0518                |
| M24    | Licor de cacao Sur del Lago                                  | 0,3680                |
| M25    | Licor Cacao Sur del Lago                                     | ≤ LD                  |
| M26    | Licor de cacao (Brisas del Sarare)                           | 2,3306                |
| M27    | Licor de cacao (Brisas del Sarare)                           | 3,5129                |
| M28    | Licor de cacao (Brisas del Sarare)                           | 7,3587                |

Al observar los resultados obtenidos en la Tabla 29 respecto al contenido de Cd máximo establecido por el reglamento de la UE N° 488/2014 (0,8 mg/kg), se encuentra que ocho de las 23 muestras exceden este límite, estos resultados son ligeramente comparables (dado su alto contenido de cacao), con los señalados por Bertoldi *et al.* (2016) y Pérez (2019) en chocolates venezolanos  $\geq 70$  % de cacao. A continuación, en la Tabla 29 se presentan los resultados obtenidos por los autores antes señalados.

**Tabla 30. Concentración de Cd en chocolates venezolanos  $\geq 70$  % de cacao.**

|                               | % Cacao | Denominación u origen | Concentración (mg/kg) |
|-------------------------------|---------|-----------------------|-----------------------|
| Pérez (2019)                  | 70      | Carenero Superior     | 1,18 ± 0,09           |
|                               | 70      | Río Caribe            | 0,18 ± 0,01           |
|                               | 70      | Sur del Lago          | 0,66 ± 0,04           |
|                               | 73,5    | Carenero Superior     | 1,22 ± 0,06           |
| Bertoldi <i>et al.</i> (2016) | 71      | -                     | 0,82                  |
|                               | 72      | -                     | 0,84                  |
|                               | 100     | -                     | 1,28                  |

Al realizar el análisis estadístico de los resultados de la Tabla 29 se determinó que existe diferencias significativas entre los resultados con ( $p < 0,05$ ) y al compararlos con los resultados de la Tabla 30 se evidencia que todos los resultados a excepción de (M5, M16, M17, M26, M27 y M28) se encuentran por debajo de los valores reportados por Pérez (2019) y Bertoldi *et al.* (2016).

En el caso de los granos de cacao completos (M6 y M8) únicamente la muestra M6 supera el límite máximo establecido por la UE N° 488/2014, los resultados obtenidos son comparables a los señalados por Lanza *et al.* (2016) para granos de cacao del estado Zulia,

Pérez (2019) y Miranda (Bertoldi *et al.*, 2016). A continuación, en la Tabla 31 se presentan los resultados antes señalados. En cuanto a las muestras M26; M27 y M28, de acuerdo a información suministrada por el productor, corresponden a lotes de diferentes parcelas en la zona, cuya extensión total es de 30 hectáreas.

**Tabla 31. Concentración de Cd en granos de cacao.**

| Referencia                    | Descripción                                       | Localidad                           | n  | Intervalo de concentración de Cd (mg/kg) | Muestras que superan el límite de la UE |
|-------------------------------|---------------------------------------------------|-------------------------------------|----|------------------------------------------|-----------------------------------------|
| Pérez (2019)                  | Granos de cacao fermentado seco sin cascarilla    | Venezuela estado Miranda            | 34 | 0,4 - 2,0                                | 79 %                                    |
| Lanza <i>et al.</i> (2016)    | Granos de cacao no fermentado seco sin cascarilla | Venezuela estado Zulia <sup>a</sup> | 4  | HF(0,95 - 1,74)<br>PF(1,57 - 1,82)       | 100 %                                   |
|                               | Granos de cacao sin cascarilla no fermentado      |                                     | 1  | HNF 2,09<br>PNF 1,90                     |                                         |
| Bertoldi <i>et al.</i> (2016) | Grano completo fermentado seco                    | Suramérica <sup>b</sup>             | 14 | 1,40 ± 0,40                              | -                                       |

Tipo de cacao <sup>a</sup>HF: híbrido fermentado, HFN: híbrido no fermentado, PF: porcelana fermentado, PNF: porcelana no fermentado.

El autor no presenta resultados por país<sup>b</sup>: Brasil (1), Ecuador (2), Perú (7) y Venezuela (4).

Al comparar los resultados de M6 y M8 con los de la Tabla 31 solo M6 se encuentra por encima de los valores obtenidos por Lanza *et al.* (2016). Cabe destacar que la diferencias pueden estar marcadas por la amplia variedad de cacao en la zona Sur del Lago de Maracaibo y su gran extensión de terreno. En el caso de Lanza *et al.* (2016), no se especifica la ubicación geográfica, mientras que en esta investigación los cacaos evaluados de esta región pertenecen a los municipios Caracciolo Parra Olmedo, Julio César Salas, Justo Briceño, Obispo Ramos de Lora y Tulio Febres Cordero del estado Mérida y municipio Sucre del estado Zulia.

Adicionalmente, se evaluaron muestras procedentes de Perú y Colombia, a continuación, en la Tabla 32 se muestran los resultados obtenidos.

**Tabla 32. Concentración de Cd en muestras del extranjero.**

| Código | País     | Descripción                                                                            | Concentración (mg/kg) |
|--------|----------|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| M12    | Perú     | Licor Cacao San Francisco de Loma Baja, provincia de Huancabamba Piura                 | 0,6875                |
| M13    |          | Licor Cacao San Francisco de Loma Alta, provincia de Huancabamba Piura                 | 0,5044                |
| M14    |          | Licor Cacao Distrito de San Juan de Bigote, provincia de Morropón, Piura               | 0,7193                |
| M19    | Colombia | Licor Cacao San Vicente de Chucuri, departamento de Santander.                         | 3,6039                |
| M23    |          | Licor Cacao Vereda Pan de Azúcar, municipio El Zulia, departamento Norte de Santander. | 0,3471                |

De acuerdo a los resultados anteriores, solo M19 proveniente de San Vicente de Chucurí supera el contenido de Cd máximo establecido por el reglamento de la UE N° 488/2014. En este caso, esta zona es conocida en Colombia como La Capital del Cacao, por su alta producción y calidad del cacao. No obstante, presenta un alto contenido de cadmio tal como señala Guerra *et al.* (2018), que de acuerdo a diversos reportes generados con base a los análisis de muestras de cacao procedentes del municipio de San Vicente de Chucurí, la concentración de cadmio en muestras de grano de cacao altamente contaminado podría ser hasta de 7 mg/kg de muestra, es decir, cerca de 70 veces el límite permitido.

Por otra parte, en cuanto a las muestras analizadas de Perú, se ha conseguido que están ligeramente por debajo del intervalo de concentración de Cd (0,84 - 3,14) mg/kg en almendras de cacao de Piura, tal como lo señala Aguirre (2020). Adicionalmente, en la Tabla 33 se presentan los valores conseguidos en la literatura para muestras de cacao de esos países.

**Tabla 33. Concentración de Cd en muestras de Perú y Colombia.**

| Referencia                    | Descripción                  | Localidad            | n  | Rango de concentración de Cd ( mg/kg) |
|-------------------------------|------------------------------|----------------------|----|---------------------------------------|
| Niño (2015)                   | Granos completos             | Colombia             | 4  | 1,54 - 2,96                           |
| Chaparro <i>et al.</i> (2017) | Chocolates <sup>a</sup>      | occidente de Boyacá  | 8  | 2,14 - 2,35                           |
|                               |                              | Chiquinquirá- Boyacá |    |                                       |
| Arévalo <i>et al.</i> (2017)  | Grano completo no fermentado | Perú                 | 10 | 1,78                                  |
|                               |                              | Tumbes               |    |                                       |
|                               |                              | Piura                |    |                                       |
|                               |                              | Cajamarca            |    |                                       |
|                               |                              | Amazonas             |    |                                       |
|                               |                              | San Martín           |    |                                       |
|                               |                              | Huánuco              |    |                                       |
|                               |                              | Junín                |    |                                       |
| Cuzco                         | 0,17                         |                      |    |                                       |

<sup>a</sup> El autor no indica el % de cacao en los chocolates analizados.

De acuerdo con los resultados hasta ahora obtenidos, Abt *et al.* (2018) y Gramlich *et al.* (2016) explican que elevadas concentraciones de Cd en cacao y sub-productos está relacionada con concentraciones elevadas de este metal en el suelo, debido a que la movilidad del Cd en el suelo y la absorción por la planta depende de las propiedades del suelo, tales como la textura, pH, capacidad de intercambio catiónico, contenido de materia orgánica, especiación química, condiciones de cultivo (Barraza *et al.*, 2017), el uso de fertilizantes fosfatados y pesticidas (Pernía *et al.*, 2008), así como la utilización de agua de riego contaminada que favorecen la liberación de este metal al suelo (Abt y Posnick 2020). En este sentido Romero *et al.* (2019), exponen que la concentración de Cd en granos de cacao y sub-productos no solo se debe al origen geográfico, sino que puede variar en zonas de un mismo país y/o región, además, en muchos casos existe la discrepancia de concentración dentro de una misma finca productora de cacao. Las elevadas concentraciones de Cd obtenidas en las muestras analizadas, específicamente (M5, M6, M15, M16, M17, M19, M26, M27 y M28) pueden ser atribuidos a las razones ya mencionadas.

### Distribución de cadmio en la matriz de cacao

Con el fin de conocer la distribución del cadmio en el grano de cacao, se llevó a cabo el fraccionamiento de la matriz partiendo desde el grano de cacao fermentado seco, para determinar la concentración de Cd en cada sub-producto, para ello se realizó el análisis por triplicado en tres muestras de cacao, a continuación, en la Tabla 34 se muestran los resultados obtenidos.

**Tabla 34. Resultados de fraccionamiento de matriz.**

| Muestras/Fracción             | M6                       | M8                    | M26                             |
|-------------------------------|--------------------------|-----------------------|---------------------------------|
|                               | Cacao de Cumboto (mg/kg) | Cacao de Cepe (mg/kg) | Cacao Brisas del Sarare (mg/kg) |
| Grano completo                | 5,1787                   | 0,4207                | 3,6145                          |
| Nibs/licor cacao              | 1,0717                   | 0,0682                | 2,3306                          |
| Cascarilla                    | 2,2824                   | 0,2095                | 0,1968                          |
| Grasa                         | ≤ LD                     | ≤ LD                  | ≤ LQ                            |
| Polvo de cacao                | 1,7597                   | 0,1304                | 1,0115                          |
| <b>Suma de las fracciones</b> | <b>5,1138</b>            | <b>0,4081</b>         | <b>3,5389</b>                   |

De acuerdo a los resultados anteriores, se aprecia que las muestras de cacao de Cumboto (M6) y cacao de Cepe (M8), ambas del estado Aragua, sus contenidos son ligeramente similares a los resultados antes obtenidos (Tabla 29). No obstante, para el caso de la muestra M26 perteneciente al cacao de Brisas del Sarare (Alto Apure), los resultados son diferentes, siendo la misma muestra de cacao. Sin embargo, son muy similares al contenido de cadmio de la muestra M27, la cual pertenece al mismo tipo de cacao. En este caso particular, posiblemente se deba a pérdidas del analito en los ensayos de los resultados de la Tabla 29 ya que en el fraccionamiento señalado en la Tabla 34 no se aprecia diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los resultados del cacao Brisas del Sarare.

Es importante señalar que la muestra M6 y M26 sobrepasan el límite permisible por la UE para cada sub-producto excepto en la grasa, estos resultados generan inquietud debido a las elevadas concentraciones ya que cada derivado de la matriz de cacao es utilizado en las industrias de confitería, chocolatería entre otras, debido a que elevadas concentraciones de Cd pueden generar un riesgo a la salud y contribuir a la exposición del consumidor a contaminantes por la ingesta de productos finalizados. La muestra M8 se encuentra dentro del máximo permisible en cada subproducto (Tabla 6).

Los resultados de los análisis de Cd en el fraccionamiento de la matriz que se presentan en la Tabla 34 se representan de manera gráfica a continuación.

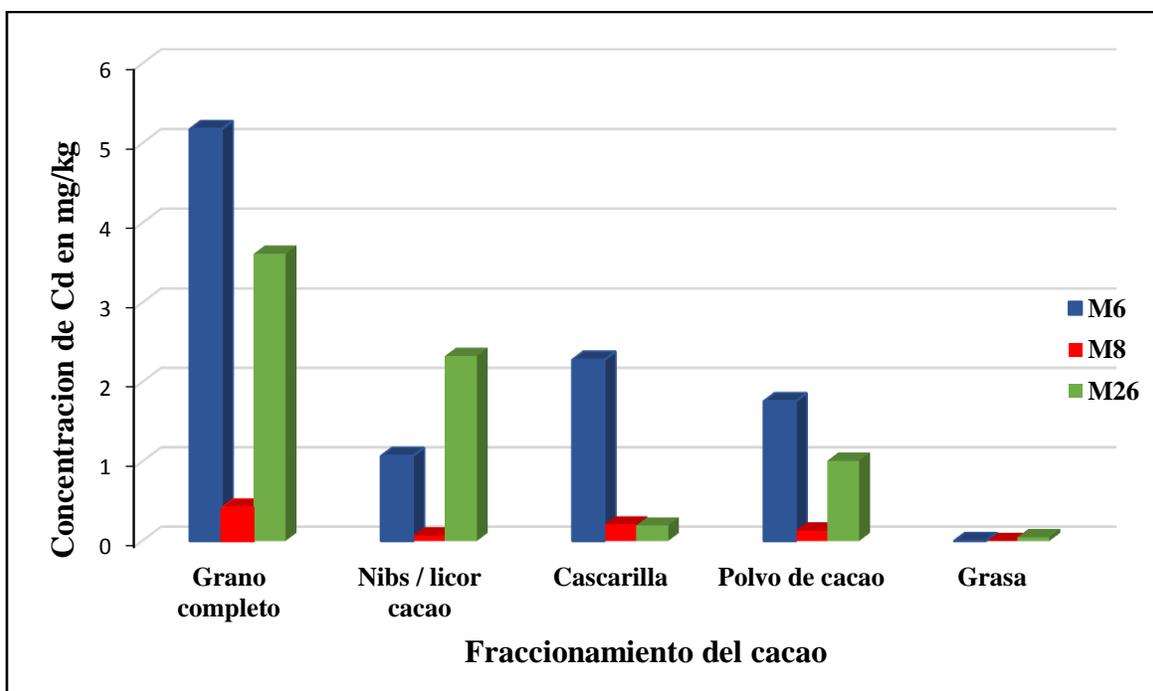


Figura 22. Comparación de resultados de muestras con fraccionamiento de matriz.

Como se observa en la Figura 22 la concentración de cadmio para el caso de M6 y M8 presentan una disminución de Cd en orden de **grano completo > cascarilla > polvo de cacao > nibs/licor de cacao > grasa**. Para M26 disminuye en el orden de **grano completo > nibs/licor de cacao > polvo de cacao > cascarilla > grasa**. Este comportamiento es muy importante ya que podría estar sujeto a una característica fisiológica de la planta o condiciones agronómicas de este cacao, tal como lo señala Yanus *et al.* (2014) y De Mesmaeker (2019).

En la Tabla 35 se presentan los resultados obtenidos por diversos autores sobre la concentración de Cd en diferentes tejidos del cacao.

Tabla 35. Resultados de fraccionamiento de matriz de diversos autores.

| Autor                               | Distribución de la concentración de Cd                                      |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Yanus <i>et al.</i> (2014)          | Polvo de cacao > cascarilla > nibs > grasa                                  |
| Chavez <i>et al.</i> (2015)         | Granos > cáscara > hojas                                                    |
| Ramtahal <i>et al.</i> (2016)       | Hojas > cáscara > cascarilla > nibs                                         |
| Barraza <i>et al.</i> (2017)        | Hojas > cascarilla > nibs                                                   |
| Gramlich <i>et al.</i> (2017)       | Hojas > cascarilla > nibs                                                   |
| Abt <i>et al.</i> (2018)            | Polvo de cacao > nibs > chocolate oscuro > chocolate leche                  |
| Lo Dico <i>et al.</i> (2018)        | Polvo de cacao > chocolate > 50% > chocolate (30 – 50) % > chocolate blanco |
| Kruszewski <i>et al.</i> (2018)     | Granos > licor de cacao > grasa                                             |
| Mohamed <i>et al.</i> (2020)        | Polvo de cacao > granos > chocolates                                        |
| De Oliveira <i>et al.</i> (2020)    | Cascarilla > granos > polvo de cacao > grasa                                |
| Vanderschueren <i>et al.</i> (2020) | Testa > nibs ~ placenta ~ cascarilla > mucilago                             |

Al observar los resultados de la Tabla 35 es notable que la literatura sobre el comportamiento de la variación de cadmio en los diferentes tejidos y derivados del cacao es variable, debido a que no se encuentra criterio de uniformidad de los resultados y en muchos casos son contradictorios. Al comparar los resultados de la Tabla 35 con la Figura 22, los resultados que se asemejan en la distribución de cadmio y la disminución de su concentración son los obtenidos por Kruszewski *et al.* (2018), en general existe uniformidad en los resultados sobre la grasa del cacao indicando en todos los casos menor concentración de cadmio, en este sentido. De Oliveira *et al.* (2020) afirman que el balance de masa del procesamiento de cacao y la distribución de cadmio durante la etapa de molienda, indican que la mayor parte del cadmio se retuvo en el residuo molido (59 %), mientras que el 35 % se transfirió al licor y el 6 % permaneció en la cascarilla. Al comparar estos resultados con las muestras cacao Cumboto (M6) y cacao Cepe (M8) la mayor parte del cadmio se retuvo en la cascarilla (44,07 y 49,79) % respectivamente, en el polvo de cacao (33,97 y 30,99) %, para el licor/nibs de cacao (20,69 y 16,21) % y en la grasa solo se obtuvo (1,27 y 3,01) % respectivamente. Para la muestra Brisas del Sarare (M26) la mayor parte del cadmio se retuvo en licor/nibs con (64,47 %), seguido del polvo de cacao (27,98 %), para la cascarilla (5,44 %) y en la grasa (2,11 %), los datos obtenidos muestran que la presencia de cadmio se encuentra principalmente en las fracciones no lipídicas de los granos de cacao.

Como se explicó anteriormente y haciendo referencia con lo expuesto por De Mesmaeker (2019) la variación de las concentraciones de cadmio en las distintos tejidos y derivados de cacao está relacionada directamente con el origen geográfico, las variaciones regionales de la biodisponibilidad del cadmio del suelo, aplicación de fertilizantes, la proximidad de los cultivos a sitios industriales o vías de tránsito que puedan aportar este metal mediante la contaminación aérea, estas variables pueden explicar las elevadas concentraciones de cadmio obtenidas para cacao Cumboto y cacao Brisas del Sarare. Sin embargo, se desconoce el manejo agronómico de este cultivo en las zonas de procedencia de estos cacaos.

Al evaluar los resultados estadísticamente se determinó que existen diferencias significativas con ( $p < 0,05$ ). Se realizó el estudio de correlación de Pearson para cada una de las muestras, cada sub-producto se correlacionó con el grano completo (Tabla 36).

**Tabla 36. Resultados de correlación de Pearson para el fraccionamiento del cadmio en el grano de cacao.**

| <b>Grano completo</b> | <b>Cacao Cumboto (M6)</b> | <b>Cacao Cepe (M8)</b> | <b>Brisas del Sarare (M26)</b> |
|-----------------------|---------------------------|------------------------|--------------------------------|
| Nibs/licor cacao      | +                         | -                      | +                              |
| Cascarilla            | -                         | -                      | +                              |
| Grasa                 | +                         | +                      | +                              |
| Polvo de cacao        | -                         | -                      | -                              |

La correlación positiva significa que a medida que el eje ordenadas (x) crece, el eje de las abscisas (y) crece de igual manera, la correlación negativa significa que cuando x crece, y decrece (Johnson y Kuby, 2007).

### Disponibilidad de cadmio en función de la temperatura y tiempo de tostado

Se realizó un ensayo variando las temperaturas y tiempo de tostado de los granos de cacao en la preparación del licor de cacao y determinar la concentración de cadmio, en la Tabla 37 se muestra los resultados de este análisis. En este caso se tomó el cacao de Brisas del Sarare para dicho estudio.

**Tabla 37. Resultados de cadmio en función de la temperatura y tiempo de tostado.**

| Muestras                                                                                | Concentración Cd (mg/kg) |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Licor cacao sin tostar                                                                  | 0,2894                   |
| Licor de cacao 50 °C x 40 min (Brisas del Sarare, Edo. Apure), septiembre de 2018       | 0,2815                   |
| Licor de cacao 50 °C x 60 min (Brisas del Sarare, Edo. Apure), septiembre de 2018       | 0,2637                   |
| Licor de cacao 70 °C x 40 min (Brisas del Sarare, Edo. Apure), septiembre de 2018       | 0,2598                   |
| Licor de cacao 125 °C x 25 min (Brisas del Sarare, Edo. Apure), septiembre de 2018      | 0,2421                   |
| Licor de cacao 120 °C x 20 min (Brisas del Sarare, Edo. Apure), septiembre de 2018      | 0,2054                   |
| Licor de cacao tostado a 120 °C x 18 min (Brisas del Sarare, Edo. Apure), abril de 2019 | 2,867                    |
| Licor de cacao tostado a 118 °C x 20 min (Brisas del Sarare, Edo. Apure), abril de 2019 | 3,0673                   |

Estos resultados indican que no hay diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre las medidas al cambiar ligeramente las condiciones de tostado del cacao. No obstante, se ha conseguido que para la misma muestra de cacao entre diferentes años de cosecha, hay diferencias importantes en el contenido de cadmio. Esto posiblemente se debe a diferentes condiciones fisiológicas de la planta o a cambios de esta naturaleza por distintos manejos agronómicos o variación de las condiciones ambientales Yanus *et al.* (2014) y De Mesmaeker (2019). En este sentido, se requiere profundizar en este tipo de investigación con otros tipos de cacao, incluso evaluar las posibles especies de cadmio que puedan formarse en el cacao, incluso de acuerdo al manejo agronómico o variedad de cacao.

## Conclusiones

- El método analítico desarrollado mediante la técnica de Espectroscopia de Absorción Atómica con Atomización Electrotérmica (ETAAS) es útil para el análisis de Cd en cacao ya que es sensible, exacto y preciso, los resultados presentan una precisión (% RSD de 1,32) y una exactitud, a través del porcentaje de recuperación de 101,3 %, razón por la cual son considerados confiables.
- Para la determinación de Cd en cacao mediante la técnica de ETAAS, se obtuvo como mejor modificador de matriz Pd, ya que el uso de este modificador permite una señal más amplia, lo cual minimiza el error y representa mayor absorbancia del analito atomizado.
- Tanto en la matriz acuosa como en la matriz de muestra las temperaturas óptimas de pirólisis y atomización para la determinación de Cd es 400 °C y 1.400 °C, respectivamente.
- Los resultados obtenidos mediante la metodología de la AOAC 999.11 son los únicos cuyo valor de CV se encuentra por debajo del < 2 %. Además, al realizar el análisis estadístico para este método se obtuvo ( $p > 0,05$ ) indicando que no existe diferencias significativas en los resultados obtenidos lo que indica que hay reproducibilidad y precisión en el método en comparación con las demás metodologías puestas a pruebas en este trabajo.
- Los resultados del estudio de interferencia muestran que la matriz de las muestras de cacao no interfiere en la determinación de Cd, el análisis estadístico de los gráficos de calibración refleja que no existe diferencia significativa en las mismas lo que hace posible realizar la calibración con patrones en medio acuoso con Cd, ya que no es necesaria la aplicación de un método de adición de estándares.
- El análisis de muestras reales se obtiene que 8 de las 33 muestras exceden el límite máximo permisible (0,8 mg/kg), la concentración de las muestras varía en un rango ( $\leq LD - 5,1787$ ) mg/kg, las concentraciones elevadas de Cd podrían ser atribuidas a la concentración de este metal en el suelo, manejo de la plantación o variedad de cacao.
- El resultado de muestras con fraccionamiento de matriz determinó para nuestro caso que el comportamiento en la disminución de la concentración de cadmio se encuentra en el orden de: **grano completo > cascarilla > polvo de cacao > nibs/licor de cacao > grasa** para el cacao de Cumboto (muestra M6) y cacao de Cepe (muestra M8), en el caso del cacao Brisas del Sarare (muestra M26) el comportamiento se encuentra en el orden de: **grano completo > nibs/licor de cacao > polvo de cacao > cascarilla > grasa**.
- Los resultados sobre la disponibilidad de cadmio en función a la temperatura y tiempo de tostado indican que ligeros cambios de estas variables no afectan la disponibilidad de cadmio en el licor de cacao.
- Se propone la técnica de absorción atómica por atomización electrotérmica en horno de grafito, para determinar los niveles de cadmio en licores de cacao de manera precisa y exacta, con una alta sensibilidad, para evaluar el contenido de cadmio en cacao venezolano.

## Bibliografía

Abt, E., Fong Sam, J., Gray, P., y Robin, L. P. (2018). Cadmium and lead in cocoa powder and chocolate products in the US Market. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 11(2), 92-102.

Abt, E., y Robin, L. P. (2020). Perspective on cadmium and lead in cocoa and chocolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Doi: 10.1021/acs.jafc.9b08295.

Aguirre, C. K. Y. (2020). Estudio del contenido del cadmio en el cultivo de cacao.

Universidad Nacional de Piura. 68 p.

Aikpokpodion, P. E., Atewolara-Odule, O. C., Osobamiro, T., Oduwole, O., y Ademola, S. M. (2013). A survey of copper, lead, cadmium and zinc residues in cocoa beans obtained from selected plantations in Nigeria. *J. Chem. Pharm. Res*, 5(6), 88-98.

Anacafé. (2004). *Asociación Nacional del café*. Recuperado el 12 de abril de 2019, de Asociación Nacional del café: [http://www.anacafe.org/glifos/index.php?title=Cultivo\\_de\\_cacao](http://www.anacafe.org/glifos/index.php?title=Cultivo_de_cacao).

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.

AOAC (2005). Official method 999.11: Determination of lead, cadmium, copper, iron, and zinc in foods. Tomado de: <https://bit.ly/2XyGfGp>.

AOAC – International. (2016). *Official methods of analysis of AOAC International*, in Guidelines for Standard Method Performance Requirements (Appendix F). Gaithersburg: AOAC International.

Araujo, L. S., Tapia, W. y Ortiz, A. V. (2020). Verificación del método analítico de espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito para la cuantificación de cadmio en almendra de cacao (*Theobroma cacao*). *La Granja*, 31(1), 56-60.

Arévalo-Gardini, E., Arévalo-Hernández, C. O., Baligar, V. C., y He, Z. L. (2017). Heavy metal accumulation in leaves and beans of cacao (*Theobroma cacao* L.) in major cacao growing regions in Peru. *Science of the Total Environment*, 605, 792-800.

Argüello, D., Chávez, E., Laurysen, F., Vanderschueren, R., Smolders, E., y Montalvo, D. (2019). Soil properties and agronomic factors affecting cadmium concentrations in cacao beans: A nationwide survey in Ecuador. *Science of the total Environment*, 649, 120-127.

ATSDR. *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*. Recuperado el 20 de abril de 2019. Agency for Toxic Substances and Disease Registry: [http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es\\_tfacts5.pdf](http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts5.pdf).

Baron, L. (2016). *Perfil de riesgo en inocuidad asociado a la presencia de residuos de cadmio en cacao (Theobroma cacao L.)* Tesis de grado. Universidad de La Salle, Bogotá. 81 p.

Barraza, F., Schreck, E., Lévêque, T., Uzu, G., López, F., Ruales, J., y Maurice, L. (2017). Cadmium bioaccumulation and gastric bioaccessibility in cacao: A field study in areas impacted by oil activities in Ecuador. *Environmental Pollution*. 229:950-963.

Beach, L., Brodie, K., y Dodge, P. (1988). Analytical methods for graphite tube atomizers. *Mulgrave, Australia: Varian Techtron Pty Limited*.

Bertoldi, D., Barbero, A., Camin, F., Caligiani, A., y Larcher, R. (2016). Multielemental fingerprinting and geographic traceability of *Theobroma cacao* beans and cocoa products. *Food Control*. 65:46-53.

Boulding, R. (1996). *Environmental assesment sourcebook*. USA. 400 p.

Bravo, L (2003). *Farmacognosia*. Madrid, España: Elsevier. p 76-81.

Burguera, J. L., Burguera, M., Rondón, C., y Burguera, E. (1997). "Determination of Lead in Whole Blood and Urine by ETAAS with Various Chemical Modifiers". *ATOMIC SPECTROSCOPY*. 18:109-113.

Cantera, V., Mateus, E., Muñoz, F., Montaya, C., Herrera, J., y Loy, J. (2008). Selección de la mejor alternativa para la industrialización de la roca fosfórica del Departamento del Huila. Neiva. *Gobernación del Huila*. Recuperado el 25 de abril de 2019, de Gobernación del Huila: [http://www.huila.gov.co/documentos/E/estudio\\_roca\\_fosforica.pdf](http://www.huila.gov.co/documentos/E/estudio_roca_fosforica.pdf).

Cárdenas, A. (2012). *Presencia de cadmio en algunas parcelas de cacao orgánico en la cooperativa agraria industrial naranjillo-Tingo María-Perú* (Tesis pregrado) Universidad Nacional Agraria de La Selva, Tingo María, Perú. 113 p.

Chaparro, A. S. P., Vargas, M. P. A., Silva, G., L. A., y Cárdenas, O. E. (2017). Cadmium voltametric quantification in table chocolate produced in Chiquinquirá-Boyaca, Colombia. *Acta Agronómica*. 66(2):172-177.

Chavarrias, M. (2012). *Nuevos niveles de Cadmio*. Recuperado el 30 de Abril de 2019, de <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/cienciaytecnologia/2012/01/04/205927.php>.

Chávez, E., He, Z. L., Stoffella, P. J., Mylavarapu, R. S., Li, Y. C., Moyano, B., y Baligar, V. C. (2015). Concentration of cadmium in cacao beans and its relationship with soil cadmium in southern Ecuador. *Science of The Total Environment*, 533, 205-214.

Chávez, E., He, Z. L., Stoffella, P. J., Mylavarapu, R. S., Li, Y. C., y Baligar, V. C. (2016). Chemical speciation of cadmium: an approach to evaluate plant-available cadmium in Ecuadorian soils under cacao production. *Chemosphere*. 150:57-62.

Clemens, S., Aarts, M. G. M., Thomine, S. y Verbruggen, N. (2013). Plant science: the key to preventing slow cadmium poisoning. *Trends in Plant Science*. 18(2):92-99.

CODEX STAN (141: enmienda 2014). *NORMA PARA EL CACAO EN PASTA (LICOR DE CACAO/CHOCOLATE) Y TORTA DE CACAO*. Recuperado el 15 de noviembre de 2019, de [www.fao.org](http://www.fao.org).

COVENIN (50:2018 1<sup>era</sup> revisión) *NORMA VENEZOLANA GRANOS DE CACAO*. Recuperado el 15 de septiembre de 2019, de [www.sencamer.gob.ve](http://www.sencamer.gob.ve).

COVENIN (1336-78) *ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DE CADMIO*. Recuperado el 16 de octubre de 2019, de [www.sencamer.gob.ve](http://www.sencamer.gob.ve).

COVENIN (1339-95) *GRANOS DE CACAO. TOMA DE MUESTRAS*. Recuperado el 3 de noviembre de 2019, de [www.sencamer.gob.ve](http://www.sencamer.gob.ve).

COVENIN (1340-1995) *CACAO Y DERIVADOS. DETERMINACIÓN DE GRASA CRUDA*. Recuperado el 24 de octubre de 2019, de [www.sencamer.gob.ve](http://www.sencamer.gob.ve).

Ćurguz, V. G., Raičević, V., Veselinović, M., Tabakovic-Tošić, M., y Vilotić, D. (2012). Influence of Heavy Metals on Seed Germination and Growth of *Piceaabies* L. Karst. *Polish Journal of Environmental Studies*. 21(2):353-359.

De Mesmaeker, V. (2019). Cadmium distribution in Ecuadorian cacao beans during post-harvest processes. KU Leuven Katholieke Universiteit, Faculteit Bio-Ingenieurswetenschappen. 86 p.

De Oliveira, A. P. F., Milani, R. F., Efraim, P., Morgano, M. A., y Tfouni, S. A. V. (2020). Cd and Pb in cocoa beans: Occurrence and effects of chocolate processing. *Food Control*. 107455.

Dico, G. M. L., Galvano, F., Dugo, G., D'ascenzi, C., Macaluso, A., Vella, A., y Ferrantelli, V. (2018). Toxic metal levels in cocoa powder and chocolate by ICP-MS method after microwave-assisted digestion. *Food chemistry*. 245:1163-1168.

- Duffus, J. H. (2002). " Heavy metals" a meaningless term?(IUPAC Technical Report). *Pure and applied chemistry*. 74(5):793-807.
- European Food Safety Authority (EFSA). (2009). Cadmium in food- Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *EFSA Journal*. 7(3):980.
- European Food Safety Authority. (2011). *Cadmium in food: Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain*. *EFSA Journal*. 9(2):19.
- Fernández, D., Vásquez, A., Ocando, A., Manzanilla, J., García, C., Nava, M., y Granadillo, V. (2003). VI Congreso Venezolano de Química. *Sociedad Venezolana de Química*. 296:976-979.
- Gramlich, A., Tandy, S., Gauggel, C., López, M., Perla D., González, V., Schulin, R. (2016). Soil cadmium uptake by cocoa in Honduras. 18th International Conference on Heavy Metals in the Environment. Ghent, Belgium. 2 p.
- Gramlich, A., Tandy, S., Andres, C., Paniagua, J. C., Armengot, L., Schneider, M., y Schulin, R. (2017). Cadmium uptake by cocoa trees in agroforestry and monoculture systems under conventional and organic management. *Science of the Total Environment*. 580:677-686.
- Gramlich, A., Tandy, S., Gauggel, C., López, M., Perla, D., González, V., y Schulin, R. (2018). Soil cadmium uptake by cocoa in Honduras. *Science of The Total Environment*. 612:370-378.
- González, A. G., Herrador, M. A., y Asuero, A. G. (1999). Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays. *Talanta*. 48(3):729-736.
- González, A. (2010). *Universidad Industrial de Santander*. Recuperado el 5 de mayo de 2019, de <http://repositorio.uis.edu.co/jspui/bitstream/123456789/387/2/134703.pdf>.
- Guerra, S. B. E., Muñoz, G. J., Gutiérrez, E. y Duarte, D. (2018). Cacao: Cadmio y Biorremediación. Grupo de Investigación en Biotecnología Agroambiente y salud MICROBIOTA, Universidad de Santander; (FEDECACAO). Colombia. Recuperado el 6 de junio de 2021, de <https://www.engormix.com/agricultura/articulos/cacao-cadmio-biorremediacion-t42789.htm>.
- He, S., He, Z., Yang, X., Stoffella, P. J., y Baligar, V. C. (2015). Soil biogeochemistry, plant physiology, and phytoremediation of cadmium-contaminated soils. In *Advances in Agronomy*. Academic Press. 134:135-225.
- INVIMA. *Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos*. Recuperado el 8 de abril de 2019 de [https://www.invima.gov.co/images/pdf/inspeccion\\_y\\_vigilancia/direccion-alimentos/subsectoriales/Documento-tecnico-Cadmio-en-cacao.pdf](https://www.invima.gov.co/images/pdf/inspeccion_y_vigilancia/direccion-alimentos/subsectoriales/Documento-tecnico-Cadmio-en-cacao.pdf)
- Kabata-Pendias, A. (2000). *Trace elements in soils and plants*. Boca Raton, USA: CRC Press, Inc. 1134-1175.
- Kruszewski, B., Obiedziński, M. W., y Kowalska, J. (2018). Nickel, cadmium and lead levels in raw cocoa and processed chocolate mass materials from three different manufacturers. *Journal of Food Composition and Analysis*. 66:127-135.
- Kowalewska, Z., Bulska, E., y Hulanicki, A. (1999). Organic palladium and palladium-magnesium chemical modifiers in direct determination of lead in fractions from distillation of crude oil by electrothermal atomic absorption analysis. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 54(5):835-843.
- Lanza J. G., Churión P., C., Liendo, N. J. y López, V. H. (2016). Evaluación del contenido de metales pesados en cacao (*Teobroma Cacao* L.) de Santa Bárbara del Zulia, Venezuela. *Saber, Universidad de Oriente, Venezuela*. 28(1): 106-115.

- Lewis, C., Lennon, A. M., Eudoxie, G., y Umaharan, P. (2018). Genetic variation in bioaccumulation and partitioning of cadmium in *Theobroma cacao* L. *Science of The Total Environment*. 640:696-703.
- 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*. 31:313-323.
- L'vov, B. V. (1978). Electrothermal atomization—the way toward absolute methods of atomic absorption analysis. *SpectrochimicaActa Part B: Atomic Spectroscopy*. 33(5):153-193.
- Matousek, J. P. (1981). Interferences in Electrothermal Atomic Absorption Spectroscopy, Their Elimination and Control. *Prog. Anal. At. Spectrosc.* 4(3):247-310.
- Mattos, J. C. P., Nunes, A. M., Martins, A. F., Dressler, V. L., y de Moraes Flores, É. M. (2005). Influence of citric acid as chemical modifier for lead determination in dietary calcium supplement samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *SpectrochimicaActa Part B: Atomic Spectroscopy*. 60(5):687-692.
- Miller J.N. y Miller J.C. (2002). Estadística y quimiometría para química analítica. Cuarta edición. Pearson Prentice Hall. Madrid, España. p 38.
- Mohamed, R., Zainudin, B. H., y Yaakob, A. S. (2020). Method validation and determination of heavy metals in cocoa beans and cocoa products by microwave assisted digestion technique with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Foodchemistry*. 303:125392.
- Mounicou, S., Szpunar, J., Andrey, D., Blake, C., y Lobinski, R. (2003). Concentrations and bioavailability of cadmium and lead in cocoa powder and related products. *Food Additives & Contaminants*. 20(4):343-352.
- Niño B. I. D. (2015). Cuantificación de cadmio en cacao proveniente del occidente de Boyacá por la técnica analítica de voltamperometría. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Facultad de Ciencias, Escuela de Ciencias Químicas. Tesis de grado. 77 p.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y Organización Mundial de la Salud (OMS). (2015). *Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias comité del CODEX sobre contaminantes de los alimentos. Anteproyecto de niveles máximos para el cadmio en el chocolate y productos derivados de cacao*. Recuperado de [http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?lnk=1&url=https%25A%25F%25Fworkspace.fao.org%25Fsites%25Fcode%25FMeetings%25FCX-735-11%25FREPORT%25FREP17\\_CFs.pdf](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?lnk=1&url=https%25A%25F%25Fworkspace.fao.org%25Fsites%25Fcode%25FMeetings%25FCX-735-11%25FREPORT%25FREP17_CFs.pdf).
- Perkin Elmer. (2003). AAnalyst 600/700/800 Manual de servicio. Recuperado de <https://www.perkinelmer.com/es/Perkin-Elmer-AAAnalyst-600-Service-Manual-And-Support-Files-/133326493602>.
- Qasim, B., Motelica-Heino, M., Joussein, E., Soubrand, M., y Gauthier, A. (2015). Potentially toxic element phytoavailability assessment in Technosols from former smelting and mining areas. *Environmental Science and Pollution Research*: 22(8):5961-5974.
- Ramírez, A. (2002). Toxicología del cadmio. Conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos. *Anales de la facultad de medicina. Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. 63:51-64. Recuperado de <http://www.redalyc.org/html/379/37963107/>.

- Ramtahal, G., Yen, I. C., Bekele, I., Bekele, F., Wilson, L., Maharaj, K., y Harrynanan, L. (2016). Relationships between cadmium in tissues of cacao trees and soils in plantations of Trinidad and Tobago. *Food and Nutrition Sciences*. 7(01): 37.
- Ramtahal, G., Chang Yen, I., Hamid, A., Bekele, I., Bekele, F., Maharaj, K., y Harrynanan, L. (2018). The Effect of Liming on the Availability of Cadmium in Soils and Its Uptake in Cacao (*Theobroma cacao* L.) In Trinidad y Tobago. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 49(19):2456-2464.
- Ramtahal, G., Umaharan, P., Hanuman, A., Davis, C., y Ali, L. (2019). The effectiveness of soil amendments, biochar and lime, in mitigating cadmium bioaccumulation in *Theobroma cacao* L. *Science of The Total Environment*. 693:133563.
- Realpe, I. D. S. B., Pardo, C. A. A., y Peinado, F. J. M. (2014). Efecto de la calidad de la materia orgánica asociada con el uso y manejo de suelos en la retención de cadmio en sistemas altoandinos de Colombia. *Acta Agronómica*. 63(2):1-14.
- Romero, E. D., Yáñez, J. G. S., Simbaña, F. K., y Navarrete, H. (2019). Content and the relationship between cadmium, nickel, and lead concentrations in Ecuadorian cocoa beans from nine provinces. *Food Control*: 106:106750.
- Ruiz Huerta, E. A., y Armienta Hernández, M. A. (2012). Acumulación de arsénico y metales pesados en maíz en suelos cercanos a jales o residuos mineros. *Revista internacional de contaminación ambiental*. 28(2):103-117.
- Santamaría, L., Martín, R., Martín, J. e Iglesias, J. (2005). Lesiones proliferativas inducidas por el cloruro de cadmio en tracto reproductor masculino. Dpto. de Morfología. Facultad de Medicina. UAM. Madrid. XX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Anatomía Patológica 2005.
- Shahid, M., Dumat, C., Khalid, S., Niazi, N. K. y Antunes, P. M. C. (2016). Cadmium Bioavailability, Uptake, Toxicity and Detoxification in Soil-Plant System. In P. de Voogt (Ed.). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 241:73-137.
- Slavin, W. (1986). Flames, furnaces, plasmas: how do we choose?. *Analytical Chemistry*. 58(4):589A-597A.
- Smulders, M. J. M., Esselink, D., Amores, F., Ramos, G., Sukha, D.A., Butler, D.R. y Van Loo, E.N. (2008). Identification of cocoa (*Theobroma cacao* L.) varieties with different quality attributes and parentage analysis of their beans. *Ingenic Newsletters*. 12:1-13.
- Song, N., Fangli, Wang, Yibing, M. A., y Shirong, Tang. (2015). Using DGT to assess cadmium bioavailability to ryegrass as influenced by soil properties. *Pedosphere*. 25(6): 825-833.
- Sturgeon, R. E., Chakrabarti, C. L., y Langford, C. H. (1976). Studies on the mechanism of atom formation in graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Analytical Chemistry*. 48(12):1792-1807.
- Thompson, M., Ellison, S. L. R., y Wood, R. (2002). International union of pure and applied chemistry technical report. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl. Chem*: 74(5):835-855.
- Thyssen, G. M., Keil, C., Wolff, M., Sperling, M., Kadow, D., Haase, H., y Karst, U. (2018). Bioimaging of the elemental distribution in cocoa beans by means of LA-ICP-TQMS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 33(2):187-194.
- Unión Europea, (UE, 2002). Propuesta de Reglamento del Parlamento Europeo y del Consejo de 14 de septiembre de 2001, relativo a los abonos (COM, 2001. 508 final. Diario Oficial C 51 E de 26.02.2002). Disponible en: <http://www.europa.eu.int/scadplus/leg/es/lvb/I21278.htm>.

Unión Europea (2014). Reglamento N° 486 de la comisión del 12 de mayo de 2014, relativo al contenido máximo de cadmio en los productos alimenticios. Disponible en; <https://www.boe.es/doue/2014/138/L00075-00079.pdf>.

Van Loon, J. A. (2012). *Analytical atomic absorption spectroscopy: selected methods*. Elsevier. 305-328.

Vanderschueren, R., De Mesmaeker, V., Mounicou, S., Isaure, M. P., Doelsch, E., Montalvo, D., Smolders, E. (2020). The impact of fermentation on the distribution of cadmium in cacao beans. *Food Research International*. 127:1-9.

Vázquez-Alarcón, A. J. Cajuste, R. Carrillo-Gonzales, B. Zamudio-Gonzales, E. Álvarez-Sánchez y J. Z. Castellanos-Ramos. (2006). Permissible Limits of Cadmium, Nickel, and Lead Accumulation of Soil in the Valley of Mezquital, Hidalgo, México. *Terra Latinoamericana*. 23:447-456.

Villa, J. E., Peixoto, R. R., y Cadore, S. (2014). Cadmium and lead in chocolates commercialized in Brazil. *Journal of agricultural and food chemistry*. 62(34):8759-8763.

Wang, J. y C. Chen. (2009). "Biosorbents for heavy metals removal and their future." *Biotechnology Advances*. 27(2):195-256.

Ward, N. I. (1995). Environmental Analytical Chemistry, En: Fifield, F. W. y Haines, P. J. Eds., Trace Elements, Blackie Academic and Professional. pp. 320-328.

Wyszkowska, J., Borowik, A., Kucharski M. y J. Kucharski. (2013). Effect of cadmium, copper and zinc on plants, soil microorganisms and soil enzymes. *Journal of Elementology*. 4(18): 769-796. Recuperado de

<http://yadda.icm.edu.pl/yadda/element/bwmeta1.element.agro-e1fd2c35-5b09-4442-9051-c70272c71ace;jsessionid=E1E9F5C82B72E6C6B92FD14C646C10C2>

Yang, Y., Chen, W., Wang, M., y Peng, C. (2016). Regional accumulation characteristics of cadmium in vegetables: influencing factors, transfer model and indication of soil threshold content. *Environmental Pollution*. 219:1036-1043.

Yanus, R. L., Sela, H., Borojovich, E. J., Zakon, Y., Saphier, M., Nikolski, A., y Karpas, Z. (2014). Trace elements in cocoa solids and chocolate: An ICPMS study. *Talanta*. 119:1-4.

Zug, K. L. M., Yupanqui, H. A. H., Meyberg, F., Cierjacks, J. S., y Cierjacks, A. (2019). Cadmium accumulation in Peruvian cacao (*Theobroma cacao* L.) and opportunities for mitigation. *Water, Air, & Soil Pollution*. 230(3):72.