



**CONSTRUCCIÓN DE UN MODELO DE SUPERFICIES DE
RESPUESTA PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN
MÉTODO ANALÍTICO EN LA EMPRESA COLCOCOA**

SAMY LEÓN PÉREZ

**Universidad de Pamplona
Facultad de Ingeniería y Arquitectura
Departamento de Ingeniería Química
Pamplona, Colombia
2017**

**CONSTRUCCIÓN DE UN MODELO DE SUPERFICIES DE
RESPUESTA PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN
MÉTODO ANALÍTICO EN LA EMPRESA COLCOCOA**

SAMY LEÓN PÉREZ

Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de:
Ingeniero Químico.

Directora:
MSc. Yaneth Cardona Rodríguez

Grupo de Investigación Biocalorimetría

Universidad de Pamplona
Facultad de Ingeniería y Arquitectura
Departamento de Ingeniería Química
Pamplona, Colombia
2017

Dedicatoria

A mis padres, Leonel León Martínez y Griseldina Pérez Hostia, por haberme forjado como la persona que soy hoy en día, por creer en mí desde el primer día que decidí elegir la Ingeniería química como mi profesión, por haberme brindado su apoyo incondicional a lo largo de mi carrera, por sus consejos que me orientan a tomar las mejores decisiones, por enseñarme a luchar por lo que quiero y a salir adelante a pesar de las adversidades que la vida nos presente. Muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este.

A mi abuela Nina, mi amiga y confidente. Por los años que me dedicó, años en los cuales comprendí el verdadero significado de la felicidad. Guardo en mi corazón los preciosos momentos que pasé contigo y aún conservo tus sabios consejos que me encaminaron por el buen sendero.

A mis hermanos, Franklin León Pérez y David León Pérez, con quienes desde pequeño comparto momentos de felicidad y tristeza, a quienes les deseo lo mejor hoy y siempre.

A mis sobrinos, Thiago David León Camacho y Frank José León Camacho, quienes con su llegada iluminan mi vida y hacen de mi día, un día mejor.

A mi tío José León Martínez, quien fue muy fundamental en la culminación de mi carrera, a él debo en gran parte este logro.

A María Elvira Hostia, quien, desde mi infancia, siempre ha estado ahí tendiéndome la mano y al pendiente de mí, alentándome a lo largo de mi vida y deseándome siempre lo mejor.

Al resto de mi familia, que de una u otra forma me han ayudado a salir adelante tanto emocional como económicamente, por haber creído en mí y no dudar en ningún momento de mis capacidades para obtener este gran logro.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, Por guiarme y acompañarme día a día en cada etapa de este proceso, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y haberme dado el don de la vida.

A la MSc. Yaneth Cardona Rodríguez, quien se ha tomado el arduo trabajo de transmitirme sus diversos conocimientos. Gracias por todo su apoyo brindado a lo largo de la carrera, por su tiempo, amistad y dedicación, por haber aceptado ser mi directora de trabajo de grado, por el compromiso que tiene con sus estudiantes hasta ver su aprendizaje y buen desarrollo. Para usted mi más grande respeto y admiración, le deseo lo mejor hoy y siempre.

A mis amigos, por siempre estar animándome a seguir a delante, por su apoyo incondicional y sobre todo por haber hecho de mi etapa universitaria un trayecto de vivencias que nunca olvidaré. Para ellos miles de bendiciones y éxitos en cada proyecto que emprendan.

Al cuerpo docente, por su apoyo brindado, por el conocimiento transmitido y paciencia en momentos de gran complejidad.

A la universidad de Pamplona, por abrirme las puertas para formarme profesionalmente y por haberme acogido a lo largo de este proceso. Tras verme dentro de ella, me he dado cuenta que más que un reto, es una base para lo concerniente a mi vida y futuro.

Al programa de ingeniería química, por haberme aceptado y respaldado a lo largo de mi carrera. Anhele que este programa crezca cada día más posicionándose como líder de su área del oriente Colombiano.

Al grupo de investigación de Biocalorimetría, por darme la oportunidad de enriquecer mi conocimiento a través de la investigación, factor fundamental para seguir creciendo profesionalmente y contribuir al desarrollo del país.

A la empresa Colcocoa, por abrirme sus puertas y permitirme realizar mis prácticas profesionales, las cuales contribuyen a mi crecimiento profesional y me quedan como experiencias adquiridas.

RESUMEN

En el presente trabajo se empleó la metodología de superficies de respuesta, con la finalidad de estandarizar y validar un método analítico para la determinación y cuantificación de cadmio (Cd) en granos de cacao (*Theobroma cacao L*) mediante digestión ácida y espectroscopia de absorción atómica (AA). Mediante un diseño Box-Behnken se encontró que el método óptimo de análisis; el cual permite una máxima extracción de cadmio en muestras de almendra de cacao en el rango de 0,01ppm a 1,6ppm, es una digestión vía ácida a 80 °C, durante un tiempo de operación de 10 minutos, con: 642,7 mg de cacao, 7,8 mL de HNO₃ y 7,6 mL H₂O₂. El método propuesto tiene buena repetibilidad, es exacto y preciso, con un límite de detección de 0,004ppm y un límite de cuantificación de 0,008ppm, además de permitir una recuperación promedio de 96,8% del analito; adicionalmente, el método presenta ventajas notables sobre el método utilizado actualmente por el laboratorio de análisis de la empresa Colcocoa; tales como, permitir el análisis de muestras en el rango de la nueva legislación que regirá desde el 2019 y agilizar el análisis de extracción y cuantificación, permitiendo mayores análisis por día a menor costo.

ABSTRACT

In this work, we used Response Surface Methodology (RSM) for the standardization and validation of an analytical method for the determination and quantification of Cadmium (Cd) in cocoa beans (*Theobroma cacao L*), using acid digestion and Atomic Absorption Spectroscopy (AA). In the standardization, we carried out a Box- Behnken design, found that the optimal method, which allow a maximum extraction of cadmium in samples of cacao beans in a range of concentration from 0.01ppm to 1.6ppm, is an acid digestion of 80 °C during ten minutes using 642.7 mg of a sample, 7.8 mL of HNO₃ and 7.6 mL of H₂O₂. The proposed method has a good repeatability, is exact and precise, and presents a limit of detection of 0.004ppm and a limit of quantification of 0.008ppm, also allowing for a recovery mean of 96.8% of analyte. On the other hand, this method has advantages which allows the anaysis of samples in the range established in new legislation that will be applied in 2019 and speed up the analysis process, making possible most analysis per day to cost less.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	II
RESUMEN.....	III
ABSTRACT	IV
LISTA DE TABLAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	X
1. INTRODUCCION.....	1
2. OBJETIVOS	2
2.1 Objetivo general.....	2
2.2. Objetivos Específicos.....	2
3. MARCO REFERENCIAL.....	3
3.1. Cacao (<i>Theobroma cacao</i> L).....	3
3.1.1 Historia del cacao.....	5
3.1.2 Cosecha.....	5
3.1.3 Fermentación	6
3.1.4 Secado	7
3.1.5 Usos y consumo en el mundo	7
3.1.6 Producción y exportación	9
3.2. Metales pesados.....	10
3.2.1 Cadmio.....	11
3.2.2 Legislación relacionada con el cadmio en cacao	12
3.3. Técnicas instrumentales de análisis.....	14
3.3.1 Espectroscopía de absorción atómica	16
3.3.1.1 Espectrometría de absorción atómica de llama	17
3.4. Validación de métodos analíticos.....	18

3.4.1 Linealidad.....	18
3.4.2 Especificidad	19
3.4.3 Limite de detección	19
3.4.4 Limite de cuantificación	19
3.4.5 Precisión	20
3.4.6 Exactitud	20
3.5. Análisis estadísticos	20
3.5.1. Metodología de superficies de respuesta.....	20
3.5.1.1 Diseño central compuesto	22
3.5.1.2 Diseño factorial a tres-niveles	22
3.5.1.3 Diseño Box-Behnken.....	23
3.5.1.4 Diseño Draper-Lin	23
3.5.2. Anova	23
4. METODOLOGÍA.....	25
4.1. Muestreo y almacenamiento.....	25
4.2. Pretratamiento de la muestra.....	25
4.3. Dopaje de las muestras	26
4.4. Metodología de superficies de respuesta	26
4.5. Validación del método analítico.....	27
4.5.1 Rango y linealidad	28
4.5.2 Limite de detección y límite de cuantificación.....	28
4.5.3 Porcentaje de recuperación.....	28
4.5.4 Exactitud y precisión	29
4.5.5 Repetibilidad.....	29
4.6 Análisis estadístico.....	29
4.7 Aplicación del método.....	29
4.8 Comparación metodologías.....	29
5. ANÁLISIS DE RESULTADOS	30
5.1 Dopaje de la muestra.....	30
5.2 Superficie de respuesta.....	30
5.3 Validación del método analítico.....	36
5.3.1 Linealidad, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)	36
5.3.2 Exactitud, precisión y repetibilidad.	37
5.3.2 Aplicación del método, en el análisis de dos muestras de la empresa Colcocoa.	38

5.3.3 Comparación del método estandarizado y validado con la metodología utilizada en la actualidad por la empresa Colcocoa.....	39
6 CONCLUSIONES.....	41
7 RECOMENDACIONES.....	42
8 BIBLIOGRAFÍA.....	43

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Empresas exportadoras y cantidades exportadas en Colombia, en el periodo 01/2013 y 04/2014.....	10
Tabla 2. Propuestas de niveles máximos para el cadmio en el chocolate y productos derivados del cacao de Colombia.....	14
Tabla 3. Ensayos de optimización.....	31
Tabla 4. Resultados de optimización.....	36
Tabla 5. Datos de validación para el método digestión ácida AA para determinación de cadmio en granos de cacao.....	36
Tabla 6. Concentración promedio y coeficientes de variación para cada nivel de concentración.....	37
Tabla 7. Comparación de métodos.....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árbol de cacao (<i>Theobroma cacao L.</i>).....	3
Figura 2. Grano de cacao.	4
Figura 3. Cosecha de la mazorca de cacao.....	6
Figura 4. Fermentación del grano de cacao.	6
Figura 5. Secado del grano de cacao.	7
Figura 6. Ubicación procedencia de las muestras.	25
Figura 7. Cuarteo de las muestras.	25
Figura 8. Equipos utilizados en el pretratamiento de las muestras. (A) Cococat cracker y (B) Clasificadora.	26
Figura 9. Equipos utilizados en el proceso de extracción y cuantificación de cadmio. (A) Digestor (ETH OS UP) y (B) Espectrofotómetro de absorción atómica.	27
Figura 10. Concentración con su respectiva desviación estándar.	32
Figura 11. Diagrama de Pareto.....	33
Figura 12. Efectos principales en el sistema, para determinación de Cd.....	34
Figura 13. Superficie de respuesta para los factores. (A) Temperatura y tiempo, (B) Volumen de ácido nítrico y peróxido de hidrogeno, (C) Temperatura y cantidad de muestra y (D) Tiempo y cantidad de muestra.	35
Figura 14. Curva de calibración para la determinación de cadmio	37
Figura 15. Ubicación de los departamentos Ocaña, Norte de Santander y Rivera, Huila..	38

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Término
Cd	Cadmio
ANOVA	Analysis of variance
UE	Unión Europea
ICCO	Organización internacional del Cacao
AA	Espectroscopia de absorción atómica
FAAS	Espectrómetro de absorción atómica de llama
ICA	Instituto Colombiano Agropecuario
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
MSR	Metodología de superficie de respuesta
MRC	Material de referencia certificado
ICONTEC	Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación
NM	Niveles máximos
LM	Límite máximo
OMC	Organización mundial del comercio
ppm	Parte por millón
ppb	Parte por billón
RSD	Desviación estándar relativa

1. INTRODUCCION

Los metales pesados llegan al organismo humano por la cadena alimenticia, a través de la ingesta de granos, verduras, carnes o dulces tales como chocolate, contaminados con dichos elementos. Uno de los metales de mayor preocupación ambiental, extremadamente tóxico y considerado perjudicial para la salud humana, es el cadmio (Cd) (Commission, 2014); el cual, se ha encontrado en diversas plantas, alimentos y granos, como el cacao (*Theobroma cacao L*), que es considerado de alto consumo a nivel mundial y es un producto con gran importancia económica en nuestro país (GENNY ROCÍO MARTÍNEZ, 2010). En la actualidad el cacao sufre de una marcada “estigmatización” en los mercados internacionales como consecuencia de la presencia de cadmio reportado en diversas investigaciones. Debido a estos resultados y dado su elevado consumo a nivel mundial, el 16 de septiembre del 2013, la Unión Europea (UE) notificó al comité de medidas sanitarias y Fitosanitarias de la Organización mundial del comercio (OMC) la enmienda al reglamento Europeo N° 1881/2006, en el cual se establecen niveles máximos (NM) de cadmio para el chocolate y productos derivados de cacao, que entra en vigor a partir del 1 de enero del 2019 (Commission, 2014).

Las empresas que comercializan este grano en países como Ecuador, Perú, México y Colombia, entre otros, buscan cumplir con los requerimientos solicitados por las directivas internacionales para su exportación; por lo cual, además de cuidar que cada una de las etapas de su análisis se realice de forma adecuada, cumpliendo los parámetros de calidad que se han establecido previamente, han implementado metodologías modernas para la determinación y cuantificación de cadmio (Pinzás, 2016); sin embargo, la aparición de reglamentaciones cada vez más estrictas, exige la mejora de los métodos existentes, con la finalidad de alcanzar menores límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) en metodologías que sean confiables y sensibles, para lo cual se requiere una estandarización y validación de los métodos empleados para este fin (Velandia Castellanos, 2008).

Una de las empresas colombianas encargada de la comercialización de cacao es Colcocoa, que se encuentra ubicada en la ciudad de Manizales, capital del departamento de Caldas. Esta empresa, busca estandarizar y validar el método relacionado con la determinación y cuantificación de cadmio en los granos mediante espectroscopia de absorción atómica (AA), asegurando de esta forma un método sensible, confiable y que cumpla con lo establecido por la nueva legislación Europea. Teniendo en cuenta la necesidad de la empresa y de acuerdo con el enfoque curricular y el perfil ocupacional del programa de Ingeniería Química de la Universidad de Pamplona, este proyecto busca utilizar un diseño de superficies de respuesta (MSR) para la estandarización y posterior validación de un método analítico que permita la determinación y cuantificación de cadmio en muestras de cacao mediante digestión vía ácida y espectroscopia de absorción atómica (AA), obteniendo una metodología óptima y confiable que permita cuantificar los valores de cadmio legislados en las muestras de la empresa Colcocoa.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Diseñar un modelo de superficies de respuesta que permita estandarizar y validar un método analítico para la determinación y cuantificación de Cadmio (Cd) en granos de cacao (*Theobroma cacao L*), para su uso en la comercialización del producto por la empresa Colcocoa.

2.2. Objetivos Específicos

- Aplicar la metodología superficies de respuesta para la selección del diseño de experimentos apropiado que permita la estandarización del método analítico.
- Validar el método estandarizado para la determinación de cadmio en granos de cacao.
- Comparar el método estandarizado y validado con el método empleado en la actualidad por la empresa Colcocoa.
- Aplicar la metodología desarrollada en dos muestras de cacao de la empresa Colcocoa, provenientes de diferentes regiones (Huila y Ocaña).

3. MARCO REFERENCIAL

3.1. Cacao (*Theobroma cacao L*)

El Cacao (*Theobroma cacao L*), cuyo nombre significa "alimento de los dioses", es un fruto de tipo tropical que crece en climas cálidos y húmedos (figura 1), usualmente por debajo de los 300 m; sin embargo, en lugares cercanos al ecuador, se encuentra a elevaciones superiores, como en algunas regiones de Colombia (1000 – 1200 m), el valle Chama de Venezuela (900 m) y en Uganda (1100 – 1300 metro) (Alvim, 1977).



Figura 1. Árbol de cacao (*Theobroma cacao L*).
Fuente: (Agropecuario, 2015).

El cacao requiere suelos muy ricos en materia orgánica, profundos, franco arcilloso, con buen drenaje y topografía regular. El factor limitante del suelo en el desarrollo del cacao es la delgada capa húmica. Esta capa se degrada muy rápidamente cuando la superficie del suelo queda expuesta al sol, al viento y a la lluvia directa. Por ello es común el empleo de plantas leguminosas auxiliares que proporcionen la sombra necesaria y sean una fuente constante de sustancias nitrogenadas para el cultivo (Trelles, 2009).

Se conocen 18 especies distintas de cacao, que se distinguen por el mayor o menor crecimiento de la planta, la forma de sus hojas, el volumen y coloración del fruto. Las semillas también varían en forma, tamaño y cualidades nutritivas (Martín, 2005); sin embargo, a rasgos generales, el cacaotero que tiene una longevidad aproximada de 40 años, presenta alturas entre 4 y 8 metros, tiene una raíz principal que crece hacia abajo hasta unos 2 metros y posee raíces secundarias que salen hacia los lados en los primeros 30 centímetros del suelo con hojas simples alargadas y enteras (Aguilar, 2013) de tamaños

considerables que oscilan entre 20 a 35 cm de largo por 4 a 15 cm de ancho (Durán Ramírez & Ramírez, 2010) y flores pequeñas y abundantes, de color amarillo rojizo que al marchitarse dejan un embrión con el fruto que luego crece, y se convierte en una especie de baya carnosa en todo su espesor, que puede alcanzar una longitud de 15 a 25 centímetros. Un único árbol puede llegar a dar 100.000 flores a lo largo de un año y estas tienen una vida promedio de 48 horas (Martín, 2005). En Colombia las variedades de cacao se obtienen básicamente por métodos tradicionales de cruces injertados entre diferentes clones, proceso que puede tomar más de 13 años para desarrollar una variedad premium. Los árboles de cacao élite presentan un alto grado de segregación cuando son multiplicados por semilla, debido a esto se han empleado diferentes sistemas de propagación clonal, tales como injertación y producción de estacas enraizadas. Dichos sistemas tienen un grado de efectividad variable al ser dependientes de las condiciones ambientales, de la cohesión entre la planta madre y el donador y de las enfermedades que aparecen durante el prendimiento (Urrea Trujillo, Atehortúa Garcés, & Gallego Rúa, 2011).



Figura 2. Grano de cacao.
Fuente: (Parra, 2017).

El grano del cacao, es una semilla encerrada en su fruto (figura 2). Una mazorca de cacao contiene entre 30 y 40 semillas, que se encuentran acomodadas en su parte carnosa y las cuales al lavarse y secarse, son empleadas para preparar una bebida llamada “Chocolate” (Martín, 2005). Estas semillas o granos son ampliamente consumidas en todo el mundo (Beg, Ahmad, Jan, & Bashir, 2017) y para su comercialización se considera la calidad de exportación, que a su vez está determinada por las características físicas y químicas del grano (Ginebra, 1991). El licor de chocolate, el cacao en polvo y la manteca de cacao, son los principales ingredientes del chocolate y una amplia gama de productos, como bebidas de cacao, helados y productos de panadería, los cuales le confieren un sabor característico y distintivo a sus productos derivados (Afoakwa, 2007).

3.1.1 Historia del cacao

El cacao, desde hace 2000 años aproximadamente, hace parte de los deleites del ser humano y es parte importante de la economía de los pueblos del mundo. Inicialmente, era considerado como fuente de alimento y riqueza por algunas tribus indígenas, tales como los Mayas y los Aztecas, ubicados en el continente Centroamericano. Desde el descubrimiento de América; el cacao, conocido como “Perla carmelita de los paladares”, se consume en todo el mundo, como alimento o manjar, especialmente en forma de chocolate (Clavijo Lemus, Saavedra, & Andrea, 2016). Pese a no ser un alimento básico de la dieta moderna, es universalmente admitido en toda buena cocina y considerado un componente gastronómico indiscutible. Se conocen diversas historias y leyendas sobre el fruto del cacao, relacionándolo en su mayoría con poderes afrodisiacos, algunas historias son sobre su uso a lo largo de los años, por diferentes personajes ampliamente conocidos, como Moctezuma, el gran Rey Azteca, que según se cuenta, lo ingería en grandes cantidades, así como la condesa de Barry, la cual lo daba a sus amantes, además se dice que Napoleón lo ingería para obtener vigor y Casanova, lo servía como champagne a sus mujeres para inducirlas al romance (Mendoza & Monserrate, 2010).

El cacaotero o árbol de cacao es originario de América del sur, apareció por primera vez hace 4.000 años al este de los andes, específicamente al sur del lago Maracaibo y el río Magdalena (Attanasi, 2007), su fruto era considerado un producto básico en algunas culturas de América e incluso sus semillas se utilizaban como moneda en las transacciones comerciales de algunos de ellos (Bluer Aplicaciones, 2010). En el siglo XVI, el cacao se introdujo en África y allí es donde se cultiva en mayores proporciones en la actualidad; sin embargo América sigue siendo un productor importante, gracias a países como Brasil, Ecuador, México, Colombia, Venezuela y la República Dominicana (Bluer Aplicaciones, 2010).

3.1.2 Cosecha

La cosecha inicia cuando el fruto está maduro y su madurez se aprecia por un cambio de pigmentación en la mazorca de cacao, pasando de verde a amarillo (figura 3) o de rojo y otros similares a un color naranja. No obstante, en frutos de coloración roja-violácea muy acentuada, el cambio puede no ser muy aparente y se corre el riesgo de no cosechar a tiempo las mazorcas que han alcanzado madurez plena, permitiendo a las mismas que maduren y germinen (Trelles, 2009).



Figura 3. Cosecha de la mazorca de cacao
Fuente: (Info región, 2013).

3.1.3 Fermentación

La fermentación del grano de cacao (figura 4) se hace necesaria para remover la pulpa que envuelve a los granos, procurar la muerte del embrión y tener activar la acción enzimática deseable (Arias de Guerrero, 1980). Es necesario efectuarla para disminuir el amargo de las almendras, consiguiendo que se formen buenos precursores del sabor, ya que con la fermentación se inicia el desarrollo del aroma, sabor y color de la almendra para obtener un cacao de aroma fino, apto para las mejores fábricas de chocolate (Censalud, 2015).



Figura 4. Fermentación del grano de cacao.
Fuente: (3BLMedia, 2012).

3.1.4 Secado

El secado del cacao (figura 5) es una de las labores más importantes después de la cosecha, pues se relaciona con las características de sabor y aroma del grano, además de que evita la proliferación de bacterias. La etapa de secado es de vital importancia, puesto que el contenido de humedad que permanece después de este proceso, es la principal característica que califican para determinar la calidad del grano (Gilces Vera & Sanmartín Fajardo, 2013).



Figura 5. Secado del grano de cacao.
Fuente: (Cacaofcaug, 2014).

3.1.5 Usos y consumo en el mundo

El cacao es uno de los cultivos que ha tenido mayor crecimiento en los últimos años en el país, debido a la fuerza e importancia que ha venido tomando por su gran demanda a nivel nacional e internacional. Actualmente, es un producto necesario para la economía del país, al ser una materia prima importante para las industrias de confitería y producción de chocolates, además de las industrias cosmética y farmacéutica (Sierra Pérez, 2017).

Como se mencionó anteriormente, el cacao se utiliza en diversas industrias, como la farmacéutica, la cosmética y la alimenticia. En la farmacéutica, se extrae la teobromina para elaborar preparados comerciales diuréticos y estimulantes del sistema nervioso; también se extrae la manteca de cacao de las semillas (parte grasa) para su aplicación en pomadas o supositorios. En la industria cosmética, se emplea el aceite, ya que este es rico en ácido esteárico, palmítico y oleico, esto le brinda propiedades humectantes y/o emolientes, de esta manera recupera la oleosidad del tejido reseco debido a la exposición excesiva de frío o sol. Por otra parte, las semillas desecadas y molidas constituyen el polvo de cacao, base del chocolate. Los granos, una vez molidos, tostados y desengrasados, se mezclan con

leche y azúcar constituyendo el producto básico en la fabricación de chocolate (Amanda Ivette Pontaza Nisthal, 2013; Anacafé, 2004).

Además de estos usos, se encuentran los medicinales, que han sido atribuidos por diversas culturas en los últimos 475 años y que en algunos casos han sido incluso controversiales; siendo los principales padecimientos, los que se citan a continuación (Waizel-Haiat, Waizel-Bucay, Magaña-Serrano, Campos-Bedoya, & San Esteban-Sosa, 2012):

- Ganancia de peso en pacientes desnutridos o portadores de enfermedades desgastantes como la tuberculosis.
- Estimulación del sistema nervioso central en personas que sufren de apatía y/o depresión, acción que ahora podría ser atribuida a la feniletilamina, teobromina y la cafeína que posee el chocolate.
- Calmar, suavizar y tranquilizar a los pacientes identificados como «sobrestimulados», especialmente aquellos que sufren de trabajo extenuante o «actividad mental abundante». En este caso, es posiblemente el sabor agradable lo que ocasiona un efecto relajante.
- Mejora en la digestión y tránsito intestinal, estimulación de los riñones e incluso curación o reducción de las hemorroides.
- Enmascarar el desagradable sabor de algunos fármacos, siendo popularmente referido como «un poco de chocolate hace pasar la medicina».

A pesar de que el cacao se produce en países subdesarrollados como África, que es el mayor productor, se consume principalmente en países desarrollados como Estados Unidos, Reino Unido entre otros. Es necesario resaltar que las compañías que producen y al mismo tiempo transforman este producto son pocas a nivel mundial (Ortega, 2012). A pesar de que España es el país en donde se inventó el chocolate, según datos recogidos por Euromonitor Internacional, España es uno de los países europeos con menor demanda del mismo, con un consumo anual de 2 kilos por persona. España se sitúa, en un ranking de 14 países, en la posición número 13, seguido de Portugal cuyo consumo es de 1,1 Kg por persona y año. Los países donde se produce un mayor consumo de chocolate son Suiza (9Kg), Alemania (7,9Kg), Irlanda y Reino Unido (7,5Kg), Noruega (6,6Kg) y Suecia (5,4Kg) (Ofertia, 2016).

Empresas como la Compañía Nacional de Chocolates, Casa Luker, Comestibles Italo, Colombina entre otras tienen que importar cacao, siendo Ecuador el principal proveedor de este grano necesario para la producción interna. El 80% del consumo nacional de cacao lo acaparan la Compañía Nacional de Chocolates y Casa Luker

(Fedecacao, 2017). A diferencia del resto del mundo, en Colombia el consumo principal es de chocolate en taza, con bajos porcentajes de cacao, mientras que los dulces o bombones tienen mayor comercialización en Europa, siendo preferidos con porcentajes superiores a 70% de cacao (comercio, 2017).

3.1.6 Producción y exportación

El departamento con mayor producción de Cacao en Colombia, es Santander que aporta 46,2% de la producción total, siguen departamentos como Arauca, Norte de Santander, Tolima, Huila, Nariño, Antioquia, Cundinamarca, los cuales en conjunto representan el 45,4% del total de la producción. Estos ocho departamentos participan en total, con el 91,6% de la producción colombiana de cacao, la cual aumentó en un 3,6 % en 2016, pasando de 54.798 toneladas a 56.785, según lo informado por Eduard Baquero López, actual presidente ejecutivo del Fondo Nacional del Cacao (Fedecacao), en un comunicado del portafolio-febrero 07 de 2017 (Fedecacao, 2017).

La exportación de cacao es importante para muchas economías en desarrollo con un valor en el mercado global de aproximadamente 12 mil millones de dólares (Jiménez Tobón, 2015); por lo cual, su potencial de producción en todo el mundo parece prometedor (Swisscontact, 2012). El cacao se produce para dos mercados diferentes: el mercado de cacao convencional sin aroma que se vende por volumen para el uso en los productos básicos y la confitería (95% de la producción total), y mercado de cacao fino de aroma (5% de la producción total) (Stoler, 2012). El Cacao Colombiano tiene la distinción del cacao fino de aroma, la cual ha sido otorgada por la organización internacional del Cacao (ICCO), al 5% del grano mundial (Sandra Mounicou, Szpunar, Lobinski, Andrey, & Blake, 2002).

La normatividad para regular la propagación y comercialización de material vegetativo de cacao en nuestro país, está a cargo del Instituto Colombiano Agropecuario- ICA, quién a través de la resolución No. 00474 de 2002 estableció las normas mínimas para producir clones de cacao en forma masiva, además de los procedimientos y requisitos que se deben llenar para inscribir los jardines clonales, productores tanto de semilla para patronaje como para proveer las varetas-portayemas para la enjertación (Jairo García Loazno, 2005).

En Colombia las exportaciones de cacao son pequeñas comparadas con los grandes exportadores de este grano a nivel mundial y se llevan a cabo en su mayoría por algunas empresas sin inclusión social de los productores primarios. Las cantidades exportadas en nuestro país mostraron un descenso considerable entre 2001 y 2004, siendo alrededor de 1700 toneladas las exportadas en 2001/02, 1500 toneladas en 2002/03 y cero y 100 toneladas en los años 2003/04 y 2004/05 respectivamente (Ruiz Pacheco, 2015). Las empresas colombianas dedicadas a la exportación de Cacao, se encuentran citadas en la tabla 1, con las cantidades exportadas, en el periodo comprendido entre el 01/2013 y 04/2014.

Tabla 1. Empresas exportadoras y cantidades exportadas en Colombia, en el periodo 01/2013 y 04/2014.

Exportador	Toneladas	Departamento
C. I. COMPAÑÍA CAFETERA AGRÍCOLA DE SANTANDER S. A.	801	Cundinamarca
FRUTOS DE LOS ANDES FRUANDES LTDA	1	Cundinamarca
CACAO DE COLOMBIA SAS	5	Cundinamarca
CASA LUKER YO SUCESORES DE JOSE JESUS RESTREPO Y CIA SA	1069	Cundinamarca
COLCOCOA SAS	201	Caldas
COOP CAFETERA DEL NORORIENTE COLOMBIANO LTDA	25	Santander
FED NACIONAL DE CACAOTEROS	126	Cundinamarca
GRAN COLOMBIA TRADING LTDA	50	Cundinamarca
OCATI S A	0	Cundinamarca
TOTAL	2278,69	

Fuente: Quintero hermanos Ltda. Citado por (Fedecacao, 2017).

3.2. Metales pesados

El término metal pesado se refiere a cualquier elemento químico metálico con una densidad relativamente alta, estos elementos son componentes naturales de la corteza terrestre y son considerados tóxicos o venenosos a concentraciones bajas (Gramlich et al., 2017). Debido a su fuerte resistencia a la degradación natural, conservan por mucho tiempo su carácter tóxico. Por lo tanto resulta de vital importancia mantener bajo control la concentración de los metales en el medio ambiente, y de modo específico la de los metales pesados (Madeddu, 2005).

Los metales pesados no son degradados o destruidos y por ello tienden a bioacumularse; es decir, tienden a aumentar su concentración en un organismo biológico en un cierto tiempo (Carbotecnia, 2014; Lenntech, 2017). Su presencia en humanos es considerada altamente peligrosa, puesto que puede dañar o reducir las funciones de la mente y el sistema nervioso central, conllevar a niveles bajos de energía, y causar daño a la composición de la sangre, pulmones, riñones, hígado y otros órganos vitales; además, su exposición a largo plazo puede resultar en el progreso lento de los procesos físicos, musculares y neurológicos degenerativos terminando en enfermedades como Alzheimer, distrofia muscular, Parkinson, y esclerosis múltiple e incluso cáncer, por lo que se consideran altamente peligrosos (INNOVVITA, 2014).

Dentro de los metales pesados, se encuentran el mercurio, el cadmio y el plomo, que son perjudiciales tanto para el ser humano como para otros organismos vivos, debido a su toxicidad y bioacumulación (Futalan, Kan, Dalida, Pascua, & Wan, 2011). Estos metales

proviene de actividades antropogénicas como la minería de oro y la fundición de metales, la producción química, la industria de cloro-álcali, la manufactura de cemento y plástico, los residuos industriales, municipales y hospitalarios, las emisiones de los rellenos sanitarios, la agricultura, los pigmentos de pintura, la preparación de aleaciones y baterías, además de algunas prácticas forestales (Camargo, 2002; Kirkham, 2006).

Uno de los metales de mayor preocupación ambiental y para la salud humana, es el cadmio (Cd), que es absorbido por las plantas, llegando al ser humano por el consumo de estos alimentos y frutos contaminados, lo cual constituye un riesgo potencial para la salud (Hugo Alfredo Huamaní-Yupanqui, 2012), pues su acumulación en los diferentes órganos trae consecuencias negativas e incluso devastadoras (Kirkham, 2006).

3.2.1 Cadmio

El Cadmio (Cd) fue descubierto en 1817 como componente de la smithsonita (Madeddu, 2005), es un elemento químico con número atómico 48 y masa molecular 112,411g/mol, es un metal considerado tóxico para las plantas, animales y seres humanos a bajas concentraciones (He & Singh, 1994). Este elemento existe como componente principal de un mineral, la greenockita (sulfuro de cadmio), que se encuentra muy raramente. El cadmio es el metal pesado tóxico más conocido que existe (Castro Jiménez, Londoño Valencia, & Morales Tabares, 2004), sus efectos se pueden resumir en que desnaturaliza las proteínas, interactúa con el calcio y el zinc en el metabolismo y produce daños en la membrana celular (Castro Jiménez et al., 2004).

El Cd entra en el medio ambiente a través de residuos industriales procedentes de procesos como la galvanoplastia, la fabricación de plásticos, la minería, los pigmentos de pintura, la preparación de aleaciones y las baterías que contienen cadmio, además de los electrodomésticos, automóviles y camiones, implementos agrícolas, partes de avión, herramientas industriales, herramientas manuales y sujetadores de todo tipo (por ejemplo, tuercas, pernos, tornillos, clavos) que son comúnmente revestidos con este elemento. El cadmio también se utiliza para los diales luminiscentes, en fotografía, curado con caucho, fungicidas e incluso en el tabaco (Kirkham, 2006).

EL Cd suele entrar en los suelos mediante la adición de lodos, compost o fertilizantes (Kirkham, 2006), en los suelos no contaminados sus concentraciones oscilan entre 0,01 y 1,1 mg/kg con un promedio de 0,41 mg/kg; sin embargo, las concentraciones reportadas, varían entre países e incluso entre regiones de un mismo país o épocas en una misma región, dados los cambios en los factores de contaminación (E Chavez et al., 2015). A pesar de que el cadmio no cumple ninguna función metabólica en las plantas, es fácilmente absorbido por ellas como catión divalente (Cd^{2+}), que es la forma más predominante y móvil de este elemento en el suelo y el medio ambiente en general (Cui, Hao, Zhang, He, & Yang,

2016; E Chavez et al., 2015; McLaughlin & Singh, 1999; Pinzás, 2016) y acumulado en su raíz, sus ramas y las partes comestibles de estas, como en el caso del cacao (*Theobroma cacao, L.*); en el cual se ha reportado presencia de cadmio en sus granos. Las plantas pueden tolerar la concentración de Cd a niveles bajos sin expresar ningún síntoma de toxicidad, pero su acumulación en las partes comestibles conlleva a efectos adversos en la salud humana, dada la ingesta de los mismos (E Chavez et al., 2015), la cual da lugar a graves daños en órganos como los pulmones y el hígado, lo que eventualmente conduce a la aparición de cáncer y otros trastornos mortales, por lo cual la contaminación por cadmio representa una amenaza mundial para la seguridad alimentaria y la salud humana (E Chavez et al., 2015).

Aunque la dosis exacta considerada como letal por ingestión de Cd es desconocida, se sabe que pequeñas ingestiones de tan sólo algunos miligramos de este, causan la aparición de síntomas notables; adicionalmente, los hallazgos patológicos en los casos mortales por ingestión de cadmio, son: inflamación gastrointestinal intensa, así como lesión hepática y renal o la presencia de efisema (estrucplan, 2009).

Teniendo en cuenta la importancia económica del Cacao y el consumo de sus productos a nivel mundial, la captación de cadmio por las plantas de cacao (*Theobroma cacao L.*) ha atraído recientemente la atención y ha generado preocupación pública, ya que se han encontrado altas concentraciones del mismo en sus granos cultivados en suelos con niveles de Cd intermedios (E Chavez et al., 2015), y también en sus productos finales (Manton, 2013). La planta de cacao absorbe el Cadmio que existe por naturaleza en los suelos y los concentra en las semillas grasosas. Este elemento afecta al Cacao en grano procedente de determinadas zonas de algunos países productores, sobre todo la región de América Latina y el Caribe. Aunque un nivel elevado de cadmio en los granos se asocia con unos niveles naturalmente elevados de cadmio en el suelo, también es probable que los niveles se vean afectados por varios factores, entre ellos el carácter físico y químico del suelo, la variedad de cacao cultivada y distintos factores antropogénicos, entre los que destaca el empleo de fertilizantes contaminados (CAOBISCO/ECA/FCC, 2015).

3.2.2 Legislación relacionada con el cadmio en cacao

El cacao colombiano está bien posicionado en el mercado internacional por su sabor y aroma; sin embargo, en materia de contaminantes, existe una preocupación a escala nacional, debido a la presencia de cadmio en las semillas. Actualmente en Europa, el límite máximo de cadmio en cacao es de 0,9 mg/Kg no obstante, debido a los resultados de las diferentes investigaciones relacionadas con el contenido de cadmio en diferentes alimentos, las cuales muestran que los productos asociados con el chocolate suelen presentar mayores concentraciones de dicho elemento, con valores medios mayores a 100 µg/Kg (Authority, 2012) , la Comunidad Europea comenzará a exigir al cacao y sus derivados unos niveles máximos de cadmio más rigurosos a partir del 2019 (Commission, 2014). En

Colombia, Hong Kong, México, Brasil, Chile, Bolivia, Perú, Japón, Ecuador, Venezuela, Rusia, Nicaragua, Guatemala, Canadá, Sudáfrica, no se encuentran legislados límites máximos de cadmio en productos derivados de cacao (Jiménez Tobón, 2015).

A continuación, se detalla la evolución de las regulaciones con respecto al cadmio en Cacao en la OMC y el CODEX Alimentarius:

➤ Comunidades Europeas y su límite máximo (LM) para el cadmio:

El 19 de diciembre del 2006, la unión Europea (UE) expidió el reglamento (CE) N°881/2006, que señala los niveles de cadmio tolerables para los distintos productos. En esta Reglamentación no se encuentran definidos los límites tolerables para el cacao y sus derivados, pues no se considera al cacao y chocolates como una fuente significativa de consumo de cadmio. En 2007, por una publicación en la revista *“Der Spiegel”* de Alemania, sobre la presencia de cadmio en el chocolate y la posibilidad de que este metal sea un agente cancerígeno, el tema se convirtió en una preocupación sanitaria que llevó a la discusión internacional sobre esta reglamentación (Rivera, 2013)

En mayo del 2011 se presentó la propuesta de la modificación del reglamento N°881/2006 EC, por la dirección general de salud y protección al consumidor DG-SANCO; en la cual, se sugirió un nivel de cadmio en cacao y chocolates de 0,30 – 0,5 mg/kg. La Unión Europea (UE) analizó la posibilidad de enmendar el reglamento (CE) N°881/2006, para incluir en la lista los límites máximos (LM) de cadmio para el cacao y productos de chocolate, a través de la Regulación (CE) N°420/2011 y de acuerdo a la definición de la directiva 2000/36/EC (Rivera, 2013).

El 16 de septiembre del 2013, la Unión Europea notificó al comité de medidas sanitarias y Fitosanitarias de la Organización mundial del comercio (OMC) la enmienda al reglamento Europeo N° 1881/2006, en el cual se establecen niveles máximos (NM) de cadmio para el chocolate y productos derivados de cacao, que entra en vigor a partir del 1 de enero del 2019 (Ecuador, 2013). Para chocolate y cacao en polvo, se establecieron de manera definitiva entre diciembre 2011 y enero 2012, cantidades permitidas de cadmio en un rango de 0,3 a 0,5 mg/Kg.

➤ Otras regulaciones internacionales

Según legislación Australiana y Neozelandesa de Metales pesados (Australian New Zealand Food Code), el contenido máximo de cadmio para chocolates y productos de cacao es de 0,5 mg/Kg (Agropecuarias, 2010).

Reglamento (CE) N°333/2007, control oficial sobre los niveles de plomo, cadmio, mercurio, estaño inorgánico, 3-MCPD y benzo(a)pireno en los productos alimenticios (Rivera, 2013).

Según las normas alimentarias del Comité del Codex sobre Contaminantes de los alimentos, niveles máximos para el cadmio en el Licor de cacao y productos derivados son:

Tabla 2. Propuestas de niveles máximos para el cadmio en el chocolate y productos derivados del cacao de Colombia.

Productos	Nivel máximo de Cadmio mg/kg
Licor de cacao	5
Cacao en polvo sin adición de azúcar	4
Chocolate (chocolatina) con leche con un contenido de materia seca total de cacao < 30 %	0,2
Chocolate (chocolatina) con un contenido de materia seca total de cacao < 50 %; chocolate con leche con un contenido de materia seca total de cacao ≥ 30 %	0,4
Chocolate (chocolatina) con un contenido de materia seca total de cacao ≥ 50 %	2,5
Cacao en polvo con adición de azúcar	0,4

Fuente: (Invima, 2015)

3.3. Técnicas instrumentales de análisis

Las técnicas de análisis instrumental son el conjunto de métodos para realizar los procedimientos de la química analítica mediante el uso de instrumentos (Hernandez, 2009), cuya finalidad es la determinación de la composición química cualitativa o cuantitativa de una muestra natural o artificial, para caracterizarla o encontrar y/o cuantificar un contaminante específico (L., 2017). Los métodos instrumentales de análisis se basan en la medida de alguna propiedad física del analito denominada señal analítica (conductividad, potencia I, absorción o emisión de luz, etc.), relacionada con la naturaleza del analito y su concentración (Peña, 2008)

Gran parte de las técnicas instrumentales pertenecen a alguna de las tres áreas consideradas como principales: Espectroscopía, electroquímica y cromatografía. Aunque algunas técnicas importantes (incluyendo la espectrometría de masas y el análisis térmico) no se ajustan convenientemente a estas clasificaciones; sin embargo, estas tres áreas proporcionan la base de un estudio sistemático de la instrumentación química (Gomis Yagües, 2008).

Los métodos instrumentales de análisis químico se han convertido en el principal medio para obtener información en diversas áreas de la ciencia y la tecnología. La velocidad, la alta sensibilidad, los bajos límites de detección, las capacidades de detección simultánea y

el funcionamiento automatizado de instrumentos modernos, comparados con los métodos clásicos de análisis, han creado este predominio. Los profesionales en todas las ciencias basan decisiones importantes, resuelven problemas y avanzan sus campos usando mediciones instrumentales. Como consecuencia, todos los científicos están obligados a tener una comprensión fundamental de los instrumentos y sus aplicaciones con el fin de responder con confianza y precisión a sus necesidades (Guthrie, Beauchamp, Buettner, & Lavine, 2015).

En la actualidad existen diversas técnicas para la determinación de metales pesados presentes en los alimentos, dentro de las cuales se encuentran fluorimetría y espectrofotometrías, tales como: espectrometría de absorción atómica (*Atomic Absorption Spectrometry* – AAS), espectrometría de absorción atómica de llama (*Flame Atomic Absorption Spectrometry* - FAAS), espectrometría de absorción atómica de horno de grafito (*Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry* -GFAAS), espectrometría de absorción por generación de hidruros (*Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry* - HGAAS), espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (*Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry* - ICP-AES) y espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry* - ICP-MS) (Cuarán, 2017).

En los últimos 30 años ha aumentado el interés sobre la determinación y cuantificación de diferentes metales pesados en alimentos, tales como cadmio, plomo, cobre y arsénico. Algunos de estos análisis se han llevado a cabo en almendras de dos variedades de cacao (*Theobroma cacao* L.), híbrido y porcelana (Lanza, Churión, Liendo, & López, 2016), productos semielaborados de chocolate (Acosta & Pozo, 2013; Chandra, Singh, & Sarkar, 2014; Lee & Low, 1985), cacao en polvo y productos afines (S Mounicou, Szpunar, Andrey, Blake, & Lobinski, 2003), suelos y hojas del cacao (Huamaní-Yupanqui, Mansilla-Minaya, Florida-Rofner, & Neira-Trujillo, 2012).

La extracción del metal en su mayoría, se ha realizado mediante digestión vía ácida, con un pre-tratamiento de secado y calcinación de las muestras y la determinación y cuantificación del mismo, mediante espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (Lee & Low, 1985) y absorción atómica acoplada con horno de grafito (Acosta & Pozo, 2013), obteniendo recuperaciones medias de 90 a 97% (Lee & Low, 1985). También se han empleado otras metodologías, como enzimólisis secuencial (S Mounicou et al., 2003) y el uso de un electrodo selectivo de membrana de PVC, para la determinación de iones de cadmio (II) presentes en el chocolate, mostrando resultados con buena selectividad y sensibilidad hacia el ion cadmio sobre una amplia variedad de cationes, incluyendo iones alcalinos, alcalinotérreos, de transición y de metales pesados (Chandra et al., 2014).

En diferentes estudios realizados en muestras de cacao y en diferentes tipos de chocolates, se han reportado niveles de cadmio que oscilan entre 0,001 a 2,73 $\mu\text{g} / \text{g}$ con promedios de 0,105 $\mu\text{g}/\text{g}$ y 0.35 mg/kg (Dahiya, Karpe, Hegde, & Sharma, 2005; Pozo Acosta, 2013); adicionalmente, se han reportado mayores concentraciones en muestras de polvo de cacao, con valores entre 94 a 1833 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectivamente (S Mounicou et al., 2003; Rehman & Husnain, 2012). Algunos estudios relacionados con la concentración de plomo y cadmio en los granos de cacao provenientes de África (Costa de Marfil) y Sudamérica (Ecuador) han reportado concentraciones de alrededor de 0,5 mg/Kg (Prugarovă & Kovăč, 1987).

En Colombia se ha realizado la determinación de algunos metales pesados como el cadmio en muestras de suelo y granos de cacao frescos y fermentados, mediante espectroscopia de adsorción atómica de llama, empleando las normas AOAC 999.11, EPA 3050B y NOM 021 (GENNY ROCÍO MARTÍNEZ, 2010) y en cacao de diferentes especies mediante métodos de voltamperometría con electrodo de mercurio y electrodo de carbón vítreo, encontrando concentraciones que superaron los niveles máximos permisibles, establecidos por la FAO/OMS (1500 ppb para cacao en polvo) en este tipo de alimentos (Niño Bernal, 2015). Adicionalmente, se ha evaluado la presencia de cadmio en chocolate amargo con 65% de cacao producido en Colombia y en chocolates extranjeros con diferentes porcentajes de cacao, mediante digestión ácida y espectrofotometría de absorción atómica de llama (FAAS), encontrando concentraciones promedio de 4,048 mg/kg en el caso del chocolate colombiano, las cuales superan los límites establecidos por el Codex Alimentarius (2,0 mg/kg) y la Unión Europea (0,8 mg/kg) (Echeverry & Reyes, 2016).

3.3.1 Espectroscopía de absorción atómica

El fenómeno de la absorción atómica (AA) se observó por primera vez en 1802 con el descubrimiento de las líneas de Fraunhofer en el espectro solar. No fue hasta 1953 que el físico australiano Sir Alan Walsh demostró que la absorción atómica podría ser utilizada como una herramienta analítica cuantitativa (Farmer, 1993).

La espectrometría de absorción atómica (AAS) es una técnica analítica que mide las concentraciones de elementos, es sensible, ya que puede medir hasta partes por billón de un gramo en una muestra. La técnica hace uso de las longitudes de onda de la luz específicamente absorbida por un elemento. Corresponden a las energías necesarias para promover electrones de un nivel de energía a otro nivel de energía más alto. Los átomos de diferentes elementos absorben las longitudes de onda características de la luz. Analizar una muestra para ver si contiene un elemento en particular significa usar la luz de ese elemento. Por ejemplo, con cadmio, una lámpara que contiene cadmio emite luz procedente de átomos de cadmio excitados que producen la combinación correcta de longitudes de onda para ser absorbida por cualquier átomo de cadmio de la muestra. En AAS, la muestra

es atomizada - es decir, convertida en átomos libres de estado fundamental en el estado de vapor - y un haz de radiación electromagnética emitida a partir de átomos de cadmio excitados se hace pasar a través de la muestra vaporizada. Parte de la radiación es absorbida por los átomos de cadmio de la muestra. Cuanto mayor es el número de átomos que hay en el vapor, más radiación se absorbe. La cantidad de luz absorbida es proporcional al número de átomos de cadmio. Se construye una curva de calibración ejecutando varias muestras de concentración de cadmio conocida en las mismas condiciones que las desconocidas. La cantidad absorbida por el patrón se compara con la curva de calibración y esto permite calcular la concentración de cadmio en la muestra desconocida. Por consiguiente, un espectrómetro de absorción atómica necesita los tres componentes siguientes: una fuente de luz; Una célula de muestra para producir átomos gaseosos; Y un medio para medir la luz específica absorbida (Welz & Sperling, 2008). Dicha técnica se utiliza con el fin de determinar el mayor número de elementos en una gran variedad de matrices, basadas en la identificación de analitos mediante el espectro emitido o absorbido por los mismos (químicos, 2012).

Algunas de las principales ventajas de la espectroscopia de absorción atómica sobre técnicas de determinación de metales pesados son: Manejo sencillo, preparación de la muestra suele ser sencillo, puede analizar hasta 82 elementos de forma directa, pocas interferencias, precisión 1% del coeficiente de variación, límites de detección < ppm y el costo del equipo es razonable (Pérez, 2013).

La AAS se ha convertido en una de las herramientas más utilizadas en química analítica. Esto se debe a que para la determinación de la mayoría de metales y metaloides la técnica ofrece suficiente sensibilidad para muchas aplicaciones y está relativamente libre de interferencias. En esta técnica se utilizan dos células de átomos básicos (un medio para convertir la muestra, usualmente un líquido, en átomos libres): (1) la llama y (2) el calentamiento electrotérmico de una célula de muestra. Generalmente se reconoce que si hay suficiente analito en la muestra, entonces se debe determinar usando una técnica de llama porque esto tiene ventajas añadidas de ser rápido (suponiendo que sólo se necesitan determinar unos pocos elementos) (Hill & Fisher, 2017).

3.3.1.1 Espectrometría de absorción atómica de llama

La elección del método analítico, depende de diferentes factores; tales como, la instrumentación disponible, la experiencia del laboratorio, los niveles de concentración del analito y el número de muestras a analizar (Cuarán, 2017).

La espectroscopia de absorción atómica con llama es el método más empleado para la determinación de metales en una amplia variedad de matrices, su popularidad se debe a su especificidad, sensibilidad (ppb) y facilidad de operación. En este método la solución muestra es directamente aspirada a una llama de flujo laminar. La llama tiene como función

generar átomos en su estado fundamental, de los elementos presentes en la solución muestra. Usa temperaturas cercanas a los 1500–3000°C que son suficientes para producir la atomización de un gran número de elementos, los que absorberán parte de la radiación proveniente de la fuente luminosa empleada (Rasmilic, 2015).

El espectrómetro de absorción atómica de llama (FAAS) permite la detección y determinación de metales en cualquier tipo de muestra industrial siempre y cuando pueda ser solubilizada. Esta técnica está especialmente indicada para determinar elementos alcalinos, alcalinotérreos y metales pesados presentes en cualquier tipo de muestra susceptible de ser disuelta. Los niveles de concentración que se pueden analizar van de desde % hasta ppb (partes por billón) (UMA, 2013).

3.4. Validación de métodos analíticos

Un método analítico se define como la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente en una muestra. Un analito se define como un componente específico en una muestra a medir en un análisis; por lo que un método analítico mide un componente específico (analito) en una muestra y como todo proceso de medición, debe ser confiable para ser utilizado con un propósito definido (Vázquez Moreno, 2015).

La validación de un método analítico, es el proceso por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas, con lo cual se establece sí un método analítico es aceptable para su propósito y por ende su aplicación es recomendable (Farmaceutico., 2002; Green, 1996). Este proceso, posee varias características; dentro de las cuales, se encuentran la linealidad, la especificidad, el límite de detección, el límite de cuantificación, la precisión y la exactitud, entre otras.

3.4.1 Linealidad

Es la capacidad del método analítico para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración o cantidad del analito en un rango definido. Se determina mediante el tratamiento matemático de los resultados obtenidos en el análisis del analito a diferentes cantidades o concentraciones. La selección del rango y del número de puntos experimentales está estrictamente relacionado con la aplicación del método (Castillo Aguilar & González Hernández, 1996).

3.4.2 Especificidad

Habilidad de evaluar inequívocamente el analito en presencia de componentes que se puede esperar que estén presentes. Típicamente éstos pueden incluir impurezas, productos de degradación, la matriz, etc (Rueda Robayo, Muñoz, & Angélica, 2015).

3.4.3 Limite de detección

Existen distintas formas de definir los límites de detección de un método de acuerdo a criterios estadísticos, basados en el cociente entre la magnitud de la señal medida y el ruido de fondo producido por el instrumento o por el blanco analítico (Richter, 2017).

Habitualmente el límite de detección (LOD) se define como la cantidad o concentración mínima de sustancia que puede ser detectada con fiabilidad por un método analítico determinado. Intuitivamente, el LOD sería la concentración mínima obtenida a partir de la medida de una muestra (que contiene el analito) que seríamos capaces de discriminar de la concentración obtenida a partir de la medida de un blanco, es decir, de una muestra sin analito presente. El primer problema aparece en la palabra fiabilidad, puesto que ésta implica la introducción de la estadística en la propia definición de LOD y en su cálculo posterior (Boqué, 1999).

El límite de detección se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\text{LOD} = \bar{X} + 3\text{SD} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde \bar{X} es el valor medio de las determinaciones y SD es la desviación estándar de las medidas.

3.4.4 Limite de cuantificación

El límite de cuantificación (LOQ) es la menor cantidad de analito en una muestra que puede determinarse con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones del experimento establecidas (Farmaceutico., 2002). Otra definición posible corresponde a la concentración mínima de un analito que puede ser cuantificada en una matriz real, la cual es tratada siguiendo todas las etapas del método empleado, incluyendo separaciones y pretratamientos. Esta mínima concentración produce una señal cuantificable con un nivel de confianza definido (Richter, 2017).

El límite de detección se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\text{LOQ} = \bar{X} + 10\text{SD} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde \bar{X} es el valor medio de las determinaciones y SD es la desviación estándar de las medidas.

3.4.5 Precisión

La precisión es una medida de la dispersión de los datos en torno a un valor central o el grado de concordancia entre mediciones replicadas de la misma cantidad, y puede expresarse como rango, desviación estándar, porcentaje del coeficiente de variación (%CV) o la varianza (Cáñez-Carrasco & García-Alegría, 2015).

3.4.6 Exactitud

Medición de la diferencia entre los resultados previstos del análisis y el valor de referencia aceptado, debido a un error sistemático del método y del laboratorio. Normalmente se expresa en porcentaje. La exactitud y la precisión determinan el error total del análisis. La exactitud se determina teóricamente utilizando material de referencia certificado (MRC) si es posible, métodos de referencia, estudios en colaboración o mediante comparación con otros métodos (Weights & Measures, 1984).

3.5. Análisis estadísticos

El análisis estadístico proporciona una metodología de análisis de la información que permite dar validez y/o confiabilidad a los datos y resultados obtenidos de la observación de un fenómeno o de la experimentación con el mismo. Para este objetivo, la estadística a través de un mecanismo observacional o experimental, toma una muestra de datos de una población en estudio, realiza un exhaustivo análisis de los datos, para luego describir y/o generalizar las conclusiones obtenidas de la muestra a toda la población involucrada en el estudio (Contreras, 2015).

3.5.1. Metodología de superficies de respuesta

La metodología de superficie de respuesta (o RSM, de *Response Surface Methodology*) es una técnica de optimización basada en planeamientos factoriales que fue introducida por G.E.P. Box en los años cincuenta, y que desde entonces ha sido usada con gran suceso en el moldeamiento de diversos procesos industriales. Esta metodología, por ejemplo, investiga el efecto de diversos factores como concentración de un reactivo, velocidad de agitación, entre otros, en el rendimiento de una determinada reacción. (Calidad, 2011).

La metodología de superficies de respuesta (MSR) es una técnica estadística que permite al investigador inspeccionar una respuesta, que se puede mostrar como una superficie, cuando los experimentos investigan el efecto que tiene el variar factores cuantitativos en los valores que toma una variable dependiente o de respuesta (Munoz Sierra, Camargo

Trillos, & Gallego Suarez, 2009). La investigación de una superficie de respuesta en primera instancia aborda la localización de la región en la cual se encuentra la respuesta óptima “Y”, en las siguientes etapas, luego de comprobar experimentalmente, va reduciendo la superficie de respuesta en estudio, en algunos casos hasta obtener la convergencia en un punto óptimo. El proceso se inicia con la planificación de un diseño experimental exploratorio que permite la aproximación a la superficie mediante la representación matemática de los modelos más simples, entre estos tenemos un modelo de primer orden (lineal) sin interacciones o productos cruzados (ecuación 3) o un modelo de primer orden (lineal) con interacciones o productos cruzados (ecuación 4).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \varepsilon \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{j=2}^k \sum_{i=1}^{j-1} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon, \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde ε representa el ruido o error observado en la respuesta Y, x_i son factores cuantitativos observados.

Primero, se utilizan experimentos factoriales completos 2^k o fraccionarios 2^{k-p} , con el fin de estimar las respuestas medias para un modelo lineal o de primer orden, como el de la ecuación 3. Se recomienda generalmente agregar dos o más observaciones en el nivel medio de cada uno de los factores para estimar el error experimental y tener un mecanismo de evaluación para saber si el modelo lineal es apropiado. Una vez identificada la región de respuesta óptima, los diseños factoriales completos o fraccionarios a dos niveles no son suficientes, pues se requieren al menos tres niveles para cada factor y el diseño debe de tener $1 + 2k + k(k - 1)/2$ puntos distintos para estimar los parámetros de un modelo de regresión cuadrática.

Por otra parte, entre los diseños experimentales que pueden ser utilizados en el modelo cuadrático o de segundo orden (ecuación 5) están los experimentos factoriales 3^k ; sin embargo, estos son considerados poco prácticos por el elevado número de combinaciones de tratamientos que requieren. Existen otros diseños desarrollados para la aproximación a una superficie de segundo orden, que no requieren tantas combinaciones de tratamientos, entre estos están los diseños centrales compuestos propuestos por Box y Wilson, y los diseños Box-Behnken (Careaga, 2015).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{j=2}^k \sum_{i=1}^{j-1} \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \varepsilon \quad (\text{Ecuación 5})$$

El procedimiento general para RSM consiste en: (Gunaraj & Murugan, 1999):

1. Diseñar una serie de experimentos para la medición suficiente y fiable de la respuesta deseable.
2. Determinar el conjunto más deseable de parámetros experimentales que producen un valor máximo o mínimo de la respuesta.
3. Expresar los efectos directos e interactivos de los parámetros del proceso como tramas de dos y tres dimensiones.

Una vez que los factores importantes que afectan a un proceso han sido identificados, usualmente corridas adicionales son necesarias para desarrollar la localización de las condiciones óptimas de los factores. Puesto que “óptimo” implica a menudo un mínimo o máximo, los diseños para optimización implican por lo menos tres niveles por cada factor para poder estimar la curvatura. En STATGRAPHICS, diferentes tipos de diseños son populares para la optimización de la respuesta se han agrupado todos como Diseños de Superficie de Respuesta. Estos incluyen (Upload, 2015) :

- Diseño Central Compuesto
- Diseño Factorial a Tres-Niveles
- Diseño Box-Behnken
- Diseño Draper-Lin

3.5.1.1 Diseño central compuesto

Cuando se busca un modelo de segundo orden que se ajuste a los datos, el diseño central compuesto, también llamado Box-Wilson es uno de los diseños más utilizados, por su gran flexibilidad. Se empieza con un diseño factorial o factorial fraccionado a dos niveles (conocido como la porción factorial), n_0 puntos centrales (que sirven para examinar la presencia de curvatura, dar información acerca de los efectos cuadráticos y estimar la magnitud del error experimental) y $2k$ puntos axiales o puntos estrella (Tarazón, 2004).

3.5.1.2 Diseño factorial a tres-niveles

Estos diseños consisten de todas las combinaciones de 3 niveles de cada factor experimental. El diseño central compuesto implica cinco niveles de cada factor experimental. Diseños más simples pueden realizarse usando solamente tres niveles por cada factor, un nivel bajo (-), nivel central (0), y un nivel alto (+). Los diseños factoriales a tres niveles generan corridas en cada combinación de estos tres niveles. Con 3 factores experimentales, se obtienen 27 corridas (Upload, 2015).

3.5.1.3 Diseño Box-Behnken

Este es un tipo de diseño experimental, propuesto por Box y Behnken, el cual tiene tres niveles en cada factor, lo que permite la estimación de un modelo cuadrático completo incluyendo interacciones, consiste de un conjunto de corridas donde cada par de factores es variado entre sus niveles bajo y alto, mientras los demás factores experimentales se fijan en el nivel medio (Enrique, Surendra, & Arnaldo, 2011; Tarazón, 2004).

3.5.1.4 Diseño Draper-Lin

Cuando los costos de experimentación son altos, el experimentador desearía reducir el número de corridas lo más pequeño posible. El diseño Draper-Lin es un Diseño central compuesto más pequeño en el cual una porción central del diseño es menor que una resolución V (Upload, 2015).

3.5.2. Anova

El análisis de la varianza (ANOVA cuyas siglas significan Analysis Of Variance, según terminología inglesa) es una colección de modelos estadísticos y sus procedimientos asociados, en el cual la varianza está particionada en ciertos componentes debidos a diferentes variables explicativas. Se utiliza cuando queremos contrastar más de dos medias, por lo que puede verse como una extensión de la prueba t para diferencias de dos medias (Andino & Belén, 2012; Tamayo, 2015).

El objetivo principal de muchos experimentos consiste en determinar el efecto que sobre alguna variable dependiente Y tienen distintos niveles de algún factor X (variable independiente y discreta). Esencialmente, el diseño para el análisis simple de la varianza consistirá en obtener muestras aleatorias e independientes del valor de Y asociado a cada uno de los distintos niveles del factor X_1, X_2, \dots, X_n . Entonces podremos determinar si los diferentes niveles del factor tienen un efecto significativo sobre el valor de la variable dependiente. El funcionamiento de la técnica ANOVA simple es, a grandes rasgos, el siguiente: a fin de comparar las medias de Y asociadas a los distintos niveles del factor (X_1, X_2, \dots, X_n), compararemos una medida de la variación entre diferentes niveles (MS-factor) con una medida de la variación dentro de cada nivel (MS-error). Si el MS-factor es significativamente mayor que el MS-error, concluiremos que las medias asociadas a diferentes niveles del factor son distintas. Esto significa que el factor influye significativamente sobre la variable dependiente Y . Si, por el contrario, el MS-factor no es significativamente mayor que el MS-error, no rechazaremos la hipótesis nula de que todas las medias, asociadas a diferentes niveles del factor, coinciden (Terrádez & Juan, 2003). Los modelos que permite construir el ANOVA pueden ser reducidos a la siguiente forma:

(Valor observado) = \sum (efectos atribuibles) + \sum (efectos no atribuibles o residuales).

El valor observado se refiere al que se obtiene en la variable cuantitativa dependiente. Los efectos atribuibles son parámetros o variables aleatorias que son el resultado de cambios en los factores o variables independientes y, por tanto, atribuibles a ellos. Aquellos efectos no atribuibles a ningún factor controlado se denominan efectos residuales o variables aleatorias residuales (Tamayo, 2015).

4. METODOLOGÍA

4.1. Muestreo y almacenamiento.

Las muestras empleadas durante la estandarización y validación fueron recolectadas en diferentes departamentos del país (figura 6), tales como Caldas, Norte de Santander y Huila. Una vez recolectadas las muestras, se realizó un cuarteo en el laboratorio de Colcocoa (ver figura 7), con el fin de obtener una submuestra de aproximadamente 250 gramos, la cual se almacenó en una bolsa plástica herméticamente sellada, hasta su posterior pretratamiento.



Figura 6. Ubicación procedencia de las muestras.

Fuente: (maps, 2017)



Figura 7. Cuarteo de las muestras.
Fuente: Autor

4.2. Pretratamiento de la muestra

El pretratamiento de las muestras se llevó a cabo tal como se realiza en la actualidad por la empresa Colcocoa y acorde al recomendado por Gramlich y colaboradores (Gramlich et al., 2017)., este procedimiento consistió en fermentar cada muestra de frijol de cacao en una caja de madera herméticamente sellada durante 5-6 días y posteriormente secarlas al sol durante 1-3 días. Una vez secos, los frijoles se sometieron a molienda en una cocoat manual cracker deluxe (cocoatown, EE.UU) (figura 8a.) y seguidamente a una clasificadora-separador-limpiador (cocoatown, EE.UU) (Figura 8b), esto con el fin de retirar la cáscara del grano de cacao.

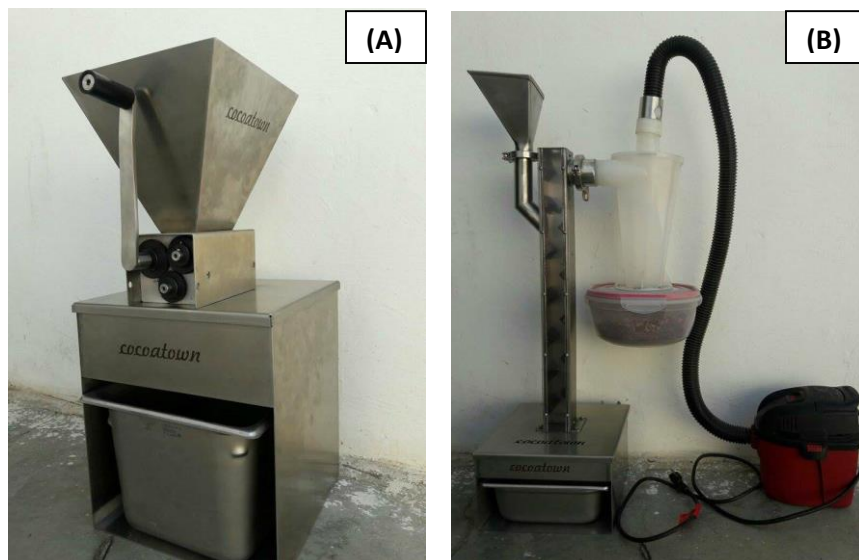


Figura 8. Equipos utilizados en el pretratamiento de las muestras. **(A)** Cococat cracker y **(B)** Clasificadora.

Fuente: Autor. Equipos ubicados en Laboratorio de Análisis, Colcocoa.

4.3. Dopaje de las muestras

Una vez realizado el pre-tratamiento, se tomaron 60 gramos de grano triturado y homogeneizado y se realizó el dopaje con 50 mL de una solución de cadmio (Cd) 0,6 ppm, con un tiempo de contacto de aproximadamente una hora, según la metodología recomendada por Martínez y colaboradores (GENNY ROCÍO MARTÍNEZ, 2010). La mezcla se sometió a secado al sol durante 4 horas y posteriormente, con la finalidad de verificar que el proceso de dopaje fue satisfactorio, se realizó un análisis preliminar del mismo, que consistió en analizar 10 alícuotas aleatorias de la muestra dopada, mediante digestión ácida y espectroscopia de absorción atómica, 48 horas después de realizado el dopaje. Los resultados obtenidos, se analizaron estadísticamente empleando un ANOVA, para corroborar la no existencia de diferencias estadísticamente significativas entre la concentración de dichas alícuotas, lo cual indica un dopaje homogéneo en las muestras a trabajar.

4.4. Metodología de superficies de respuesta

En este trabajo, se construyó un modelo de superficies de respuesta para obtener los ensayos de digestión necesarios mediante Box-Behnken, para encontrar las condiciones óptimas de análisis. Estos ensayos se realizaron y leyeron en un espectrofotómetro de absorción atómica para determinar la concentración de cadmio en las muestras y posteriormente realizar su validación.

Los factores que se incluyeron en el modelo fueron: tiempo de análisis (10 – 60 minutos), temperatura (40°C – 200°C), cantidad de muestra (300 – 700 mg), volumen de ácido nítrico (1 – 12 mL) y volumen de peróxido de hidrógeno (1 – 12 mL); los cuales, fueron escogidos teniendo en cuenta el método actualmente empleado en Colcocoa, los requerimientos técnicos del digestor de la empresa (MILESTONE-ETHOS UP, fabricado en Shelton, Connecticut-EE.UU.) y las recomendaciones de otros autores (Arévalo-Gardini, Arévalo-Hernández, Baligar, & He, 2017; E Chavez et al., 2015; E. Chavez et al., 2016; Gramlich et al., 2017; Lee & Low, 1985).

Los ensayos se realizaron en un digestor Ethos UP-milestone (figura 9A) y las mediciones en un espectrofotómetro de absorción atómica (Thermo Scientific-iCE 3000) (figura 9B), a una longitud de onda de 228,8 nm, utilizando una lámpara de cátodo hueco y una llama de aire-acetileno. El método mencionado anteriormente es acorde a la metodología empleada por otros autores (Arévalo-Gardini et al., 2017; E. Chavez et al., 2016; GENNY ROCÍO MARTÍNEZ, 2010).

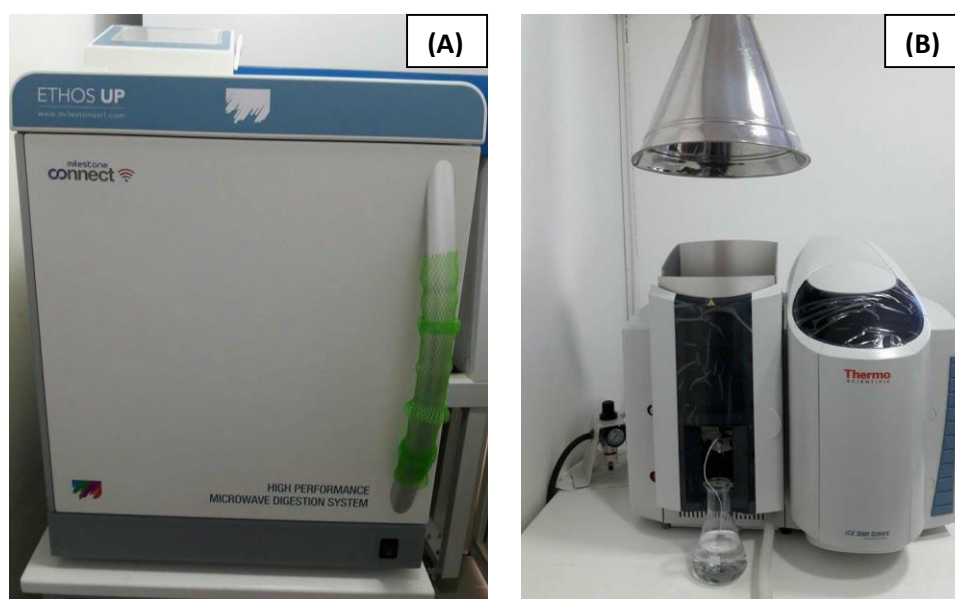


Figura 9. Equipos utilizados en el proceso de extracción y cuantificación de cadmio. **(A)** Digestor (ETH OS UP) y **(B)** Espectrofotómetro de absorción atómica.

Fuente: Autor. Equipos ubicados en Laboratorio de Análisis, Colcocoa

4.5 Validación del método analítico

Una vez se obtuvieron las condiciones óptimas de análisis, se procedió a validar el método estandarizado, evaluando su porcentaje de recuperación, su exactitud, precisión, límite de detección, límite de cuantificación y repetibilidad.

4.5.1 Rango y linealidad

Se estableció un rango de análisis de 0,01 ppm hasta 1,6 ppm, teniendo en cuenta el historial de análisis de la empresa Colcocoa y los valores establecidos en la nueva legislación internacional y nacional, que regirá a partir del 2019. De esta forma, la curva de calibración empleada se realizó con los siguientes valores de concentración en partes por millón (ppm): 0,01; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5; 1,0 y 1,6. Dicha curva se realizó por triplicado, así como las diferentes soluciones que la componen.

4.5.2 Límite de detección y límite de cuantificación

Para determinar los límites de detección y cuantificación, se realizaron 5 lecturas de un patrón de baja concentración (0,0015 ppm) muy cercana al blanco. Una vez obtenidos los datos de dichas lecturas se aplicaron las ecuaciones 1 y 2, enunciadas en los ítems 3.4.3 y 3.4.4 respectivamente.

4.5.3 Porcentaje de recuperación

Para determinar el porcentaje de recuperación, se doparon tres muestras de cacao una con concentración alta, otra con concentración media y la última con concentración baja; con la finalidad de evaluar la recuperación del método en el rango de concentración establecido en la curva de calibración. De cada muestra se utilizaron 45 gramos y la metodología expuesta anteriormente en el ítem 4.3 (dopaje de muestra). Cabe mencionar que las muestras de cacao empleadas para estos dopajes pertenecían a un mismo lote y no contenían cadmio; lo cual, se corroboró analizando las muestras antes de su dopaje.

45 gramos de cacao triturado se doparon en cada caso, con 50mL de solución de cadmio (Cd) 45 ppm (concentración alta), 15 ppm (concentración media) y 0,36 ppm (concentración baja), respectivamente.

Diferentes alícuotas de las muestras dopadas se analizaron mediante la metodología establecida y se determinó su porcentaje de recuperación durante una semana, empleando la ecuación 6.

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Concentración experimental}}{\text{Concentración teórica}} * 100\% \quad (\text{Ecuación 6})$$

4.5.4 Exactitud y precisión

La exactitud y la precisión de la metodología, se evaluaron teniendo en cuenta el porcentaje de recuperación y el coeficiente de variación en las diferentes muestras analizadas a lo largo de la semana en las tres concentraciones de dopaje (alto, medio y bajo). El coeficiente de variación se calculó con la ecuación 7 que se da a conocer a continuación:

$$CV = [SD / \bar{X}] * 100\% \quad (\text{Ecuación 7})$$

Donde:

\bar{X} : Media aritmética

CV: Coeficiente de variación

SD: Desviación estándar

4.5.5 Repetibilidad

Para la repetibilidad se tuvo en cuenta el procedimiento realizado a las muestras de alta, media y baja concentración analizadas durante 7 días (ver metodología 4.5.3) y se observó la variabilidad de la concentración de cada muestra a lo largo de un día, empleando la misma muestra homogénea y el mismo equipo.

4.6 Análisis estadístico

El análisis mediante RSM y los cálculos de validación se llevaron a cabo empleando el paquete estadístico Statgraphics Centurion (versión de prueba). Adicionalmente, se realizó un análisis de varianza en los diferentes ensayos con la finalidad de encontrar si había diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos.

4.7 Aplicación del método.

Haciendo uso del método estandarizado y validado, se determinó la concentración de cadmio en dos muestras reales de la empresa Colcocoa, provenientes de Huila y Ocaña.

4.8 Comparación metodologías.

Se eligió una muestra de la empresa Colcocoa y se analizaron por triplicado dos alícuotas de la misma, una por la metodología seguida por la empresa Colcocoa en la actualidad y otra por la metodología estandarizada y validada en este trabajo. Una vez realizados los ensayos se prosiguió a realizar una comparación de los mismos.

5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1 Dopaje de la muestra

Es imposible que las alícuotas de una muestra sean idénticas en la totalidad de sus características; sin embargo, las diferencias existentes entre ellas deben ser exclusivamente debidas al azar y no a una falta de homogeneización de las mismas; por ende, con la finalidad de verificar un correcto dopaje de las muestras, se realizó el ensayo preliminar descrito en la sección 4.3 (dopaje de las muestras).

El ensayo mencionado, dio en promedio una concentración de $1,1075 \pm 0,031$ mg/Kg de cadmio. Un ANOVA aplicado a los resultados obtenidos, mostró que no existían diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos por triplicado para las 10 alícuotas analizadas; con lo cual se comprobó la homogeneización en el dopaje de las muestras y se pudo proseguir con la estandarización del método.

5.2 Superficie de respuesta

El diseño empleado es de segundo orden, ya que nos permitió estudiar, además de los efectos lineales y de interacción, los efectos cuadráticos o de curvatura pura. Por consiguiente, este diseño nos facilitó explorar la región de la superficie de respuesta, dándonos como indicativo que el punto óptimo estaba presente dentro de la región experimental. El modelo de segundo orden está dado por:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \epsilon$$

Las matrices de diseño, la geometría y las propiedades de los diseños de segundo orden más recomendados son el diseño de Box-Behnken y el diseño central compuesto o de composición central. Teniendo en cuenta lo anterior y el número de factores experimentales presentes, se dedujo que el diseño debía tener por lo menos tres niveles en cada factor para estimar la curvatura de la superficie en la dirección de cada factor, por ello se escogió un diseño Box-Behnken, ya que es este se aplica cuando se tienen 3 o más factores y suelen ser eficientes en cuanto al número de corridas.

Para la optimización del proceso se procuró encontrar una aproximación adecuada de la verdadera relación funcional entre la variable de respuesta y el conjunto de variables seleccionadas (Temperatura, tiempo, cantidad de muestra, etc...). Para ello se empleó el software Statgraphics Centurion y se realizó un diseño Box-Behnken, en el cual se estudió el efecto de 5 factores experimentales en 46 corridas con 6 repeticiones al centro, dando como resultado 40 ensayos diferentes y 6 iguales (tabla 3), en los cuales varían los valores

de cada factor. El orden de los experimentos es totalmente aleatorizado, esto con el fin de aportar protección contra el efecto de variables ocultas. Los ensayos se realizaron por triplicado con el fin de tener una mayor confiabilidad de los datos obtenidos.

Tabla 3. Ensayos de optimización.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	HNO ₃ (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Cantidad de muestra (mg)	Concentración de cadmio promedio (ppm)
120	35	6,5	6,5	500	0,810 ± 0,013
200	35	6,5	1,0	500	0,846 ± 0,028
200	35	12	6,5	500	0,898 ± 0,035
200	60	6,5	6,5	500	1,081 ± 0,031
120	10	6,5	6,5	700	1,251 ± 0,008
40	60	6,5	6,5	500	0,818 ± 0,001
40	35	6,5	12	500	0,703 ± 0008
120	35	1,0	1,0	500	0,493 ± 0,014
120	35	6,5	6,5	500	0,807 ± 0,013
120	60	6,5	12	500	0,976 ± 0,046
120	10	6,5	12	500	0,898 ± 0,063
200	35	6,5	12	500	0,887 ± 0,028
120	35	6,5	6,5	500	0,807 ± 0,013
120	35	6,5	1,0	700	0,978 ± 0,008
120	60	1,0	6,5	500	0,683 ± 0,021
120	35	12	6,5	700	1,230 ± 0,012
200	35	1,0	6,5	500	0,737 ± 0,069
40	10	6,5	6,5	500	0,875 ± 0,007
120	60	6,5	6,5	700	1,119 ± 0,119
120	35	12	6,5	300	0,308 ± 0,032
120	35	6,5	1,0	300	0,304 ± 0,008
200	35	6,5	6,5	700	1,243 ± 0,044
120	35	12	12	500	0,953 ± 0,027
200	35	6,5	6,5	300	0,591 ± 0,103
120	60	6,5	6,5	300	0,334 ± 0,044
40	35	6,5	6,5	700	0,971 ± 0,022
120	35	6,5	6,5	500	0,807 ± 0,013
120	10	12	6,5	500	0,861 ± 0,008
120	35	12	1,0	500	0,950 ± 0,019
120	10	1,0	6,5	500	0,649 ± 0,002
40	35	6,5	1,0	500	0,701 ± 0,001

120	35	1,0	6,5	300	0,299 ± 0,010
40	35	6,5	6,5	300	0,457 ± 0,002
120	35	1,0	6,5	700	0,989 ± 0,004
120	10	6,5	1,0	500	0,744 ± 0,010
120	35	6,5	6,5	500	0,807 ± 0,013
40	35	1,0	6,5	500	0,694 ± 0,004
120	10	6,5	6,5	300	0,585 ± 0,040
120	60	12	6,5	500	1,016 ± 0,021
200	10	6,5	6,5	500	1,078 ± 0,024
120	35	1,0	12	500	0,975 ± 0,031
120	60	6,5	1,0	500	0,820 ± 0,007
120	35	6,5	6,5	500	0,807 ± 0,013
120	35	6,5	12	300	0,566 ± 0,071
120	35	6,5	12	700	1,221 ± 0,019
40	35	12	6,5	500	0,971 ± 0,002

Fuente: Autor. Análisis realizado con Statgraphics Centurion

A continuación, se presenta la concentración de cada ensayo obtenido con su respectiva desviación estándar (ver figura 10). En dicha figura se denota que el ensayo 19 obtuvo la mayor desviación estándar (0,119).

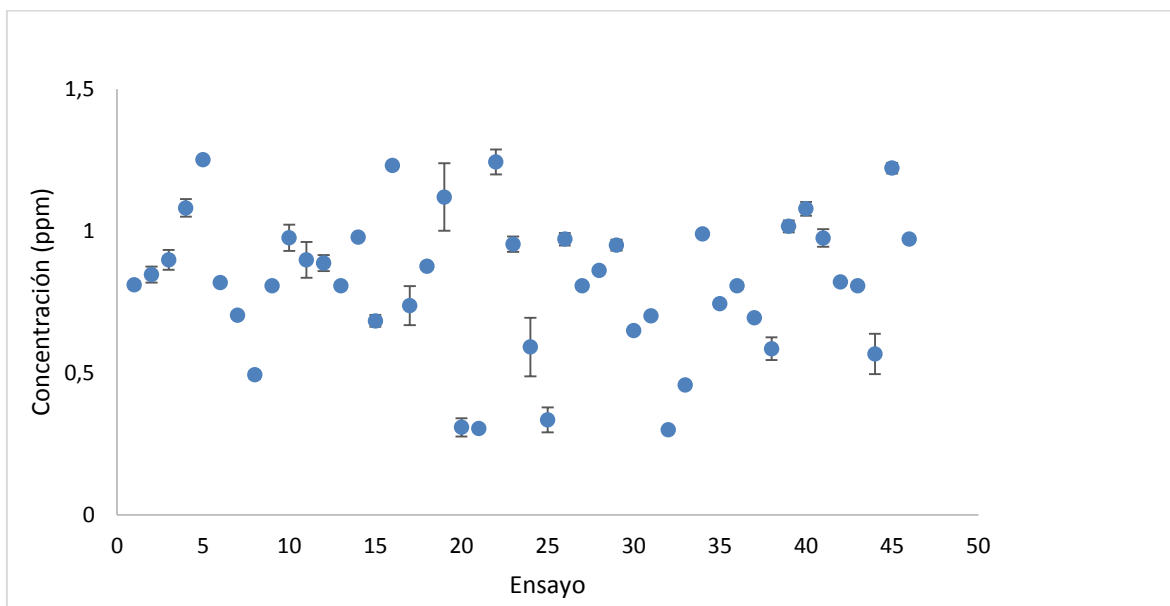


Figura 10. Concentración con su respectiva desviación estándar.

Fuente: Autor. Realizada en Microsoft Excel.

Una vez obtenidos los resultados de optimización, se prosiguió a determinar las estimaciones para cada uno de los efectos estimados y sus interacciones; así como el factor de inflación de varianza (V.I.F.) y el error estándar de cada uno de dichos efectos, el cual mide su error de muestreo.

Los resultados obtenidos de los efectos estimados para cadmio, indicaron que la variable más significativa fue la cantidad de muestra y la menos significativa fue el tiempo. Un valor máximo para el factor de inflación de varianza dio como resultado 1,20. La influencia en la variable de respuesta del sistema, ante cambios en las diferentes variables, se pueden observar claramente y de manera estandarizada en el diagrama de Pareto (figura 11); en la cual se evidencia y confirma que la cantidad de muestra es la variable que mayor predominio tuvo sobre la respuesta.

Mediante un análisis ANOVA se encontró que, en este caso, 5 efectos (temperatura, volumen de HNO₃, volumen de H₂O₂, cantidad de muestra y relación entre volumen de HNO₃ y volumen de H₂O₂), tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0% y por ende tienen incidencia en la metodología para extracción y determinación de cadmio en cacao. Adicionalmente, los resultados del análisis estadístico realizado evidencian que el modelo ajustado explica 92,08% de la variabilidad en la concentración de Cadmio.

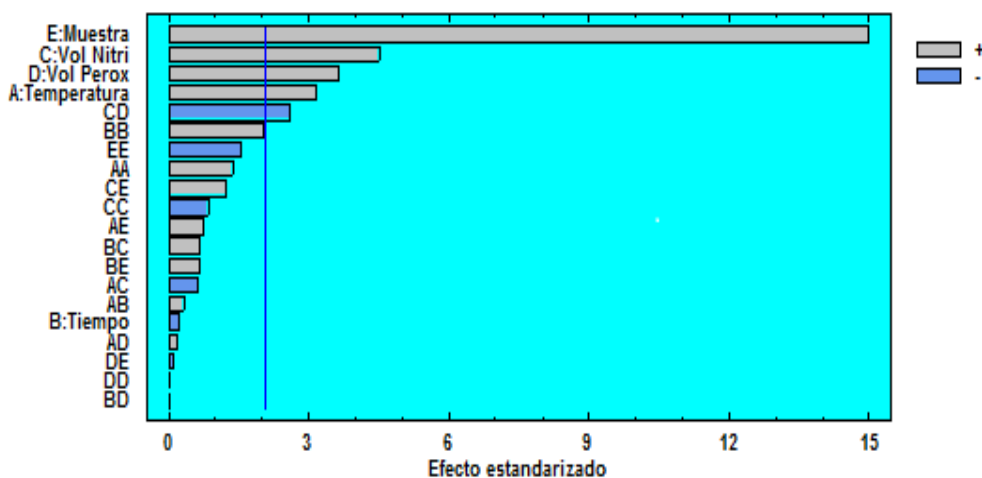


Figura 11. Diagrama de Pareto
Fuente: Autor. Realizado con Statgraphics Centurion.

Los resultados también indican que el modelo de superficie de respuesta realizado tiene buena calidad de predicción, ya que explica más del 70% del comportamiento de la respuesta. Los efectos principales en el sistema se ilustran en la figura 12. A medida que la pendiente sea mayor, es decir, que la diferencia entre el nivel bajo y alto es más grande, el efecto sobre la respuesta es más influyente, es preciso aclarar que estos efectos son

representativos para los intervalos establecidos para cada una de las variables en la configuración de contacto con la cual se trabajó (Munoz Sierra et al., 2009).

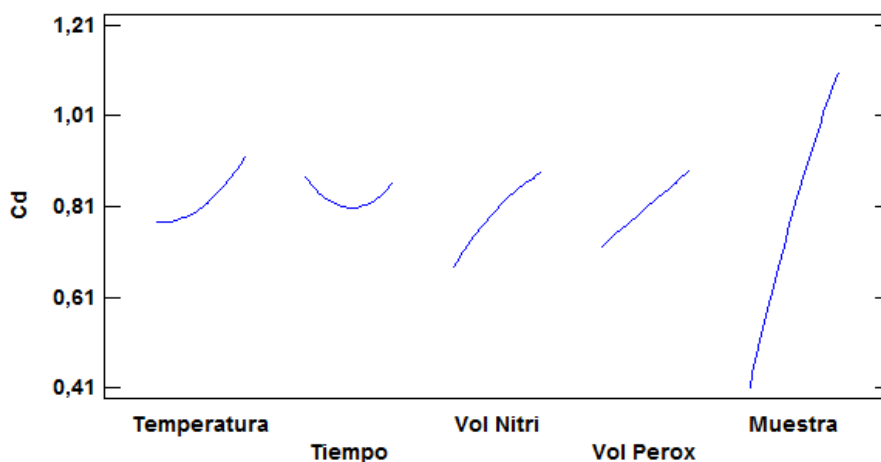


Figura 12. Efectos principales en el sistema, para determinación de Cd
Fuente: Autor, realizado con Statgraphics Centurion

En la figura 12 se evidencia que el efecto principal en el sistema es la cantidad de muestra y el menor el tiempo; tal como se había enunciado en párrafos anteriores, adicionalmente, se muestra una representación de las demás variables incluidas en el modelo y las cuales tienen influencia sobre la variable de respuesta.

En la figura 13 que se expone a continuación, se muestra el comportamiento de las variables en el proceso, obteniendo el modelo del análisis de superficie de respuesta. Cada una de las superficies despliega el trayecto de máximo ascenso (o descenso). Este es el trayecto, desde el centro de la región experimental, a través del cual la respuesta estimada cambia más rápidamente con un cambio menor en los factores experimentales. A demás cada región especifica los valores para los niveles de cada factor.

En la figura 13A, se representa la interacción de los factores experimentales, temperatura y tiempo, sobre la concentración de cadmio, se nota que el tiempo es casi constante a lo largo de toda la superficie, esto nos indica que su influencia sobre el mesurando es prácticamente despreciable, mientras que a temperaturas cercana al nivel medio establecido (120 °C) se notan niveles máximos cadmio. Con lo cual es justo establecer que la temperatura tiene cierto efecto o influencia en el proceso de extracción. La poca influencia del tiempo sobre el proceso, en parte, se puede explicar debido a que la distancia entre los niveles bajos y altos, no es considerable, ya que el equipo de digestión para cada lapso de operación establece un tiempo de enfriamiento. Por lo tanto, la variabilidad aleatoria presente en la respuesta podría estar ajustando al ruido el verdadero efecto del tiempo en el modelo y en el proceso de extracción como tal.

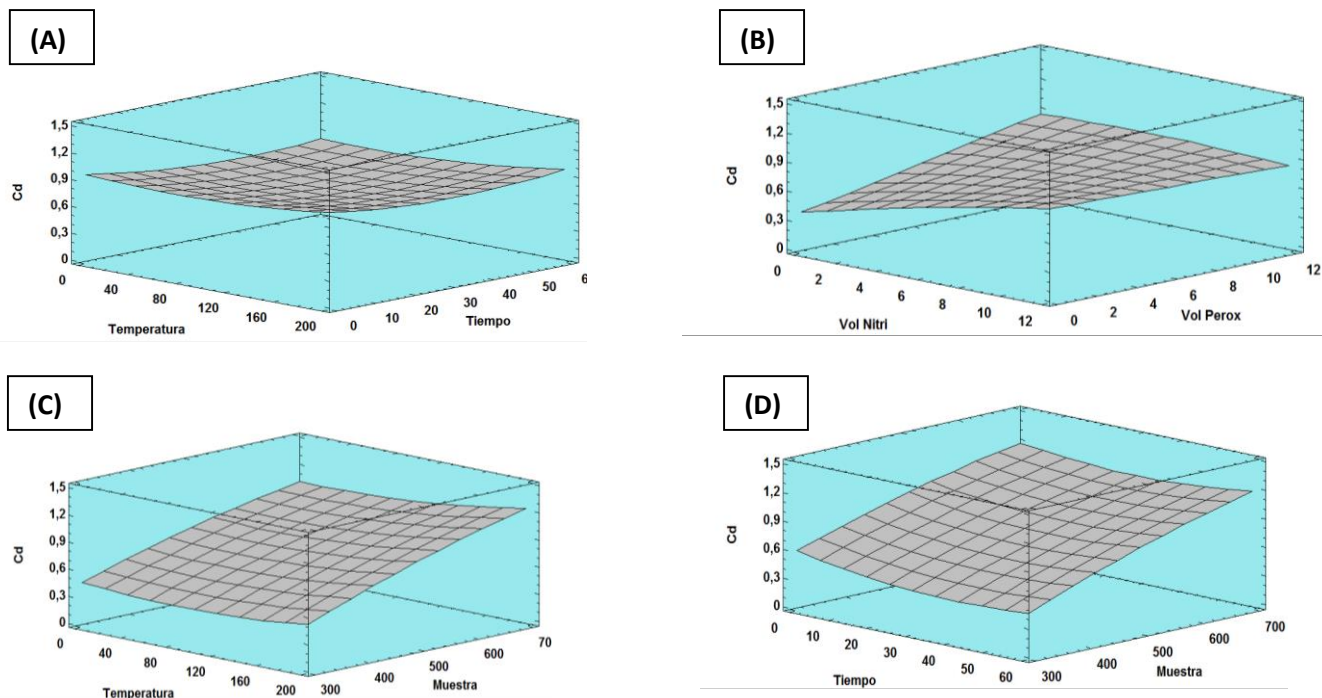


Figura 13. Superficie de respuesta para los factores. **(A)** Temperatura y tiempo, **(B)** Volumen de ácido nítrico y peróxido de hidrogeno, **(C)** Temperatura y cantidad de muestra y **(D)** Tiempo y cantidad de muestra.

Fuente: Autor, realizado con Statgraphics Centurion

Para la superficie en la cual se evidencia la interacción de volumen de ácido nítrico y volumen de peróxido de hidrogeno sobre la concentración de cadmio obtenida (figura 13B), se observa que para niveles bajos y altos de ambas sustancias la extracción de cadmio no es máxima; por consiguiente, el óptimo del proceso tanto para la cantidad de ácido como de peróxido radican a niveles medio, con lo cual se asume que estos dos factores tienen una influencia significativa a lo largo del proceso, tanto por separado, como en interacción.

Las figuras 13C y 13D muestran el comportamiento o la influencia de la cantidad de muestra en el proceso, interactuando con la temperatura y el tiempo respectivamente. En estas gráficas, se evidencia que en ambos casos, a mayores cantidades de muestra, se obtienen mayores concentraciones de cadmio; por lo cual, es válido afirmar que en el rango experimental trabajado, mayores cantidades de muestra favorecen la extracción de cadmio en la almendra de cacao. Adicionalmente, este hecho conlleva a que una de las condiciones para encontrar el proceso de extracción óptimo, es trabajar con una cantidad de muestra superior al nivel medio establecido para este factor (500 mg).

Para determinar las condiciones óptimas de operación; es decir, las condiciones en las cuales se obtiene la máxima concentración de cadmio presente en la almendra de cacao y por ende la mayor recuperación del metal (tabla 4), se realizó un análisis de las diferentes

superficies obtenidas, trabajando con el rango de factores experimentales dados y las condiciones del proceso establecidas. Con este análisis se optimizó la respuesta y se dio confiabilidad para validar el método analítico estandarizado.

Tabla 4. Resultados de optimización.

Factor	Nivel bajo	Nivel medio	Nivel alto	Óptimo
Cantidad de muestra (mg)	300	500	700	642,7
Tiempo (minutos)	10	30	60	10
Temperatura (°C)	40	120	200	80
Volumen - HNO ₃ (mL)	1	6,5	12	7,8
Volumen - H ₂ O ₂ (mL)	1	6,5	12	7,6

Fuente: Autor. Análisis realizado con Statgraphics Centurion

5.3 Validación del método analítico

5.3.1 Linealidad, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)

La linealidad del método fue evaluada utilizando 7 concentraciones diferentes en el rango 0,01 – 1,600 mg/mL obteniendo un coeficiente de correlación (R^2) que exhibe una buena linealidad en el rango de concentraciones examinadas (ver tabla 5). Un análisis ANOVA realizado a los ensayos corridos por triplicado, mostró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las lecturas con un 95% de confianza. La curva de calibración se puede observar en la figura 14 y la tabla 5 también exhibe los valores calculados de LOD (Proporción señal a ruido de 3; S/N = 3) y LOQ (Proporción señal a ruido de 10; S/N = 10).

Tabla 5. Datos de validación para el método digestión ácida AA para determinación de cadmio en granos de cacao.

.PÁRAMETRO	VALOR
Ecuación	$Y = 0,461 X + 0,014$
Rango Lineal (mg/L)	0,01 – 1,600
N	7
Intervalo de confianza	99,7%
m	0,461
b	0,014
R^2	0,997
LOD (mg/L)	0,004
LOQ (mg/L)	0,008
Recuperación (%)	96,8
RSD	1,29
N	3
S_{er}	$\pm 0,025$

Fuente: Autor

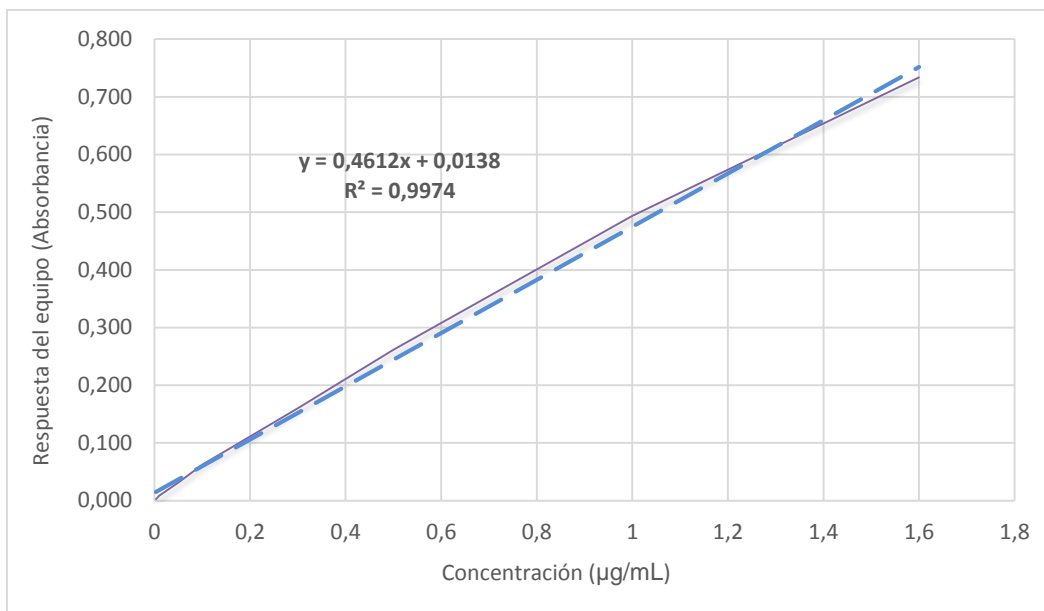


Figura 14. Curva de calibración para la determinación de cadmio
Fuente: Autor. Realizada en Microsoft Excel.

5.3.2 Exactitud, precisión y repetibilidad.

La evaluación de la exactitud del método se basó en la recuperación de cantidades conocidas de cadmio en muestras de cacao dopadas homogéneamente, con tres concentraciones diferentes (1,2408, 0,4463 y 0,0106 mg/Kg), las cuales fueron analizadas por triplicado de acuerdo a las condiciones óptimas. La precisión del método fue evaluada durante un día y una semana y los valores de repetibilidad fueron calculados analizando muestras (n=3) a las mismas tres concentraciones (1,2408, 0,4463 y 0,0106 mg/Kg).

Se observó que el promedio del porcentaje de recuperación para las muestras fue de 96,8% y según Ortiz, 2004 el porcentaje de recuperación es aceptable desde 95% (Ortiz, Palma, & Peñaranda, 2004); por lo cual, se puede decir que el método validado es exacto. Es necesario resaltar que entre las tres concentraciones experimentadas (alta, media y baja), se observaron mayores recuperaciones a menores concentraciones de cadmio dopado; sin embargo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre ellos.

Tabla 6. Concentración promedio y coeficientes de variación para cada nivel de concentración.

	Concentración baja (mg/Kg)	Concentración media (mg/Kg)	Concentración alta (mg/Kg)
Concentración Promedio	0,01 ± 0,0003	0,45 ± 0,003	1,24 ± 0,025
% CV	2,82	0,66	2,03

Fuente: Autor

La tabla 6 muestra los valores de coeficiente de variación para los 3 grupos de muestras analizadas durante 7 días. En dicha tabla se observa que para las muestras dopadas con una concentración alta el coeficiente de variación es de 2,03; para las de media concentración es de 0,66 y finalmente para las muestras de baja concentración el coeficiente de variación es de 2,82; por lo cual, se puede decir que la técnica es precisa y alcanza su mayor precisión al analizar concentraciones ubicadas en sectores medios de la curva de calibración.

Los valores obtenidos de recuperación de cadmio y desviación estándar relativa (RSD) (Ver tabla 5), son considerados adecuados para el análisis de cadmio y muestran que la reproducibilidad de este método es satisfactoria. Teniendo en cuenta los resultados de validación obtenidos (tabla 5) y el hecho de que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones halladas para una muestra en un mismo día, ni durante una semana de análisis, a 3 concentraciones diferentes (alta, media y baja); se puede asegurar que la validación fue satisfactoria y que el método tiene buena repetibilidad, siendo confiable y pudiendo ser usado para el análisis de cadmio en muestras de cacao tanto en el rango exigido por la legislación actual, como por la nueva que regirá desde el 2019.

5.3.2 Aplicación del método, en el análisis de dos muestras de la empresa Colcocoa.

Una vez estandarizado y validado el método analítico, se analizaron dos muestras de la empresa Colcocoa, provenientes de dos departamentos diferentes del territorio Colombiano (figura 15), una de Ocaña-Norte de Santander (Cooperativa Catatumbo) y la otra de Rivera-Huila (Cooperativa Cadefihuila).



Figura 15. Ubicación de los departamentos Ocaña, Norte de Santander y Rivera, Huila.
Fuente: (maps, 2017)

Las muestras analizadas dieron como resultado una concentración de cadmio de 1,07 y 0,59 mg/kg respectivamente, lo cual significa que el lote al cual pertenece la muestra proveniente de Ocaña, Norte de Santander, no puede ser exportado, debido a que no cumple con la reglamentación internacional, pues supera el límite máximo establecido por la legislación Europea actual. Por otra parte, el lote de cacao de Rivera, Huila cumple las condiciones de calidad, relacionadas con el contenido de cacao máximo y por ende puede procederse a su trámite para exportación.

Se hace necesario resaltar que la concentración de cadmio encontrada en las dos muestras de cacao analizadas, supera el límite máximo contemplado en la nueva legislación, la cual regirá a partir del año 2019 como se ha mencionado en párrafos anteriores.

5.3.3 Comparación del método estandarizado y validado con la metodología utilizada en la actualidad por la empresa Colcocoa.

La comparación de las dos metodologías, se realizó teniendo en cuenta la muestra proveniente de Rivera Huila. La concentración encontrada dio un valor promedio de 0,6ppm por los dos métodos de análisis y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de concentración obtenidos por triplicado mediante los dos métodos, al analizarlos mediante un ANOVA, con un 95% de confianza. Sin embargo, sí se encontró una diferencia en cuanto a costos, pues al calcular el costo neto de gasto en cada análisis para una muestra, se observó que el método propuesto requiere un menor gasto que el método empleado actualmente por la empresa (Ver tabla 7). Este menor costo se relaciona con el menor tiempo de digestión, que a su vez favorece el número de muestras a analizar en un día y hace considerable el ahorro monetario en la empresa a largo plazo.

Actualmente, en el laboratorio de análisis de la empresa Colcocoa, se tratan alrededor de 50 muestras de cacao al mes, las cuales están siendo analizadas con la actual metodología para determinación de cadmio; con un gasto aproximado de \$1.886.650. El método propuesto vincula un gasto de aproximadamente \$1.236.450 para el análisis de estas muestras; por lo cual, con el método estandarizado y validado en este trabajo, el laboratorio de análisis de la empresa Colcocoa se ahorraría alrededor de \$650.200 mensuales, reemplazando la metodología para determinación de cadmio en muestras de cacao, que además de ser confiable le permitirá determinar las concentraciones de dicho metal pesado en el rango establecido por la nueva legislación, que empezará a regir desde el año 2019.

Tabla 7. Comparación de métodos.

	método actual	método propuesto
Concentración (mg/Kg)	0,64 ± 0,003	0,59 ± 0,06
Cantidad de muestra (mg)	700	642,7
Ácido nítrico (mL)	9	7,8
Peróxido de hidrogeno (mL)	1	7,6
Tiempo de digestión (min)	50	10
Temperatura (°C)	200	80
Costo de análisis	37.733	24.729

Fuente: Autor.

6 CONCLUSIONES

En la extracción de cadmio en granos de cacao, las 5 variables: temperatura, cantidad de muestra, volumen de ácido nítrico, volumen de peróxido de hidrógeno y relación de volumen ácido nítrico y peróxido de hidrógeno, tienen efectos significativos sobre la variable de respuesta, tal como se comprobó con un análisis de varianza; sin embargo, la cantidad de muestra es el factor con mayor influencia y el tiempo el factor menos significativo; tal como se evidenció en el análisis de superficie de respuesta y el diagrama de Pareto.

Teniendo en cuenta los factores experimentales propuestos, según el modelo de superficie de respuesta, el método óptimo de análisis; el cual permite una máxima extracción de cadmio en muestras de cacao en el rango elegido, es una digestión vía ácida a 80 °C, durante un tiempo de operación de 10 minutos, con: 642,7 mg de cacao, 7,8 mL de HNO₃ y 7,6 mL H₂O₂.

La metodología propuesta en este trabajo para la extracción y cuantificación de cadmio en muestras de almendra de cacao es confiable, siendo un método exacto, preciso y con buena repetibilidad, que permite un porcentaje de recuperación satisfactorio; tal como se evidencia en los resultados de validación del mismo, por lo cual se puede decir que la aplicación de este método para análisis de cadmio en muestras de cacao en la empresa Colcocoa es recomendable y la metodología de superficies de respuesta es de gran utilidad en la estandarización de métodos analíticos de este tipo.

El método propuesto presenta un porcentaje de recuperación satisfactorio que no difiere significativamente del porcentaje de recuperación del método empleado actualmente en la empresa Colcocoa; sin embargo, el método propuesto es más económico y presenta ventajas adicionales, tales como, el hecho de permitir el análisis de muestras dentro del rango establecido en la nueva legislación que regirá a partir del 2019 y adicionalmente, el permitir agilizar el proceso de análisis de muestras, haciendo posible realizar mayores análisis por día a menor precio, con lo cual disminuye los costos de análisis.

7 RECOMENDACIONES

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo y el hecho de que las dos muestras analizadas no cumplen con los rangos establecidos en la nueva legislación, se recomienda realizar investigaciones relacionadas con la acumulación de cadmio en granos de cacao y la remediación del mismo; pues es probable que estas concentraciones sigan en aumento, debido a la acumulación de este metal, lo cual imposibilite la exportación de esta materia prima trayendo consigo grandes problemas a esta industria en nuestro país a futuro.

8 BIBLIOGRAFÍA

- 3BLMedia. (2012). The Hershey Company Lanza un Programa Para Restaurar el Cultivo de Cacao en el Sur de México.
- Acosta, S., & Pozo, P. (2013). Determinación de cadmio en la almendra de cacao (*Theobroma cacao*) de cinco fincas ubicadas en la vía Santo Domingo-Esmeraldas, mediante espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito. *InfoANALÍTICA*(1).
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., & Vieira, J. (2007). Factors influencing rheological and textural qualities in chocolate e a review. *Trends Food Science and technology*.
- Agropecuarias, I. I. n. A. d. I. (2010). Avances del monitoreo de presencia de cadmio en almendras de cacao, suelos y aguas en Ecuador. Retrieved from
- Agropecuario, P. (2015). El arbol de cacao cumple diez millones de años. Retrieved from <http://www.pregonagropecuario.com/cat.php?txt=7252>
- Aguilar, C. (2013). El cacao en sistemas agroforestales. Lutheran World Relief.
- Alvim, P. d. T. (1977). CHAPTER 10 - Cacao Ecophysiology of Tropical Crops (pp. 279-313): Academic Press.
- Amanda Ivette Pontaza Nisthal, E. S. E. M. (2013). Uso del *Theobroma cacao* sp. (cacao) recolectado en el área de alta verapaz para la fabricación de cuatro cosméticos. (Investigativa), Universidad de San Carlos de Guatemala
- Anacafé. (2004) Cultivo de cacao.
- Andino, V., & Belén, A. (2012). Diseño Estadístico Experimental para el Estudio de la Respuesta del Maíz (*Zea Mays* L.) a la Aplicación Edáfica Complementaria de Tres Tipos de Abono Sintético a Dos Dosis en la Comunidad de Peñas, Cantón Tiwintza, Provincia de Morona Santiago.
- Arévalo-Gardini, E., Arévalo-Hernández, C. O., Baligar, V. C., & 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. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.122>
- Arias de Guerrero, A. M. (1980). Resúmenes de tesis de cacao presentadas a la Escuela para Graduados de Turrialba, 1948-1979.
- Attanasi, A. (2007). Chocolate: Origen e historia. Retrieved from <http://www.monografias.com/trabajos7/choco/choco.shtml>
- Authority, E. F. S. (2012). Cadmium dietary exposure in the European population. *Eur. Food Saf. Authority (EFSA) J.* 10, 2551. Retrieved from
- Beg, M. S., Ahmad, S., Jan, K., & Bashir, K. (2017). Status, supply chain and processing of cocoa - A review. *Trends in Food Science & Technology*, 66, 108-116. doi:10.1016/j.tifs.2017.06.007
- Bluer Aplicaciones, S. L. (2010). Eliminación de olores en la industria del cacao.
- Boqué, R. (1999). El límite de detección de un método analítico. *Universitat Rovira i Virgil, Tarragona*.
- Cacaofcaug. (2014). Proceso de secado del cacao - Secado al natural (horas luz).
- Calidad, C. d. I. d. I. (2011). Metodología de Superficies de Respuesta, gran alternativa para incrementar la productividad de sus procesos. <http://www.cicalidad.com/articulos/RSM.pdf>
- Camargo, J. A. (2002). Contribution of Spanish-American silver mines (1570–1820) to the present high mercury concentrations in the global environment: a review. *Chemosphere*, 48(1), 51-57.

- Cáñez-Carrasco, M. G., & García-Alegría, A. M. (2015). Validación de un método analítico para la determinación de fósforo por espectrofotometría ultravioleta-visible/validation of an analytical method for uv-visible spectrophotometric phosphorus determination. *Biotecnia*, 17(1), 32-39.
- Caobisco/eca/fcc. (2015). Chocolate and Cocoa Industry Quality Requirements. Retrieved from <https://es.scribd.com/document/328212863/Cacao-en-Grano-Requisitos-de-Calidad-de-la-Industria-Apr-2016-es-pdf>
- Carbotecnia. (2014). Metales Pesados Carbotecnia.
- Careaga, M. G. J. (2015). Superficies de Respuesta mediante un Diseño Central Compuesto. *Revista Varianza*, 11, 31-36.
- Castillo Aguilar, B., & González Hernández, R. (1996). Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. *Revista Cubana de Farmacia*, 30(1), 0-0.
- Castro Jiménez, C. C., Londoño Valencia, J., & Morales Tabares, J. F. (2004). Efecto de los metales pesados cadmio y níquel sobre la producción de metano de un lodo anaerobio a escala de laboratorio.
- Censalud. (2015). Fermentación de Cacao.
- Clavijo Lemus, M. A., Saavedra, A., & Andrea, P. (2016). Eficiencia Económica en la Producción de Cacao en Rionegro-Santander.
- comercio, M. i. y. (2017). Colombia le apuesta al cacao. Retrieved from <http://www.inviertaencolombia.com.co/revista-virtual/989-colombia-le-apuesta-al-cacao.html>
- Commission, T. E. (2014). Commission regulation (EU) No 488/2014 of 12 May 2014 amending regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of cadmium in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union*. Retrieved from
- Contreras, F. A. (2015). Análisis estadístico de una tesis.
- Cuarán, E. J. V. (2017). Analisis y diagnostico en calidad fisico-quimico del cacao. Universidad Nacional de Palmira.
- Cui, X., Hao, H., Zhang, C., He, Z., & Yang, X. (2016). Capacity and mechanisms of ammonium and cadmium sorption on different wetland-plant derived biochars. *Science of the total environment*, 539, 566-575. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.022>
- Chandra, S., Singh, D., & Sarkar, A. (2014). PVC membrane selective electrode for determination of cadmium (II) ion in chocolate samples. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 22(4), 480-488.
- Chavez, E., He, Z., Stoffella, P., Mylavarapu, R., Li, Y., Moyano, B., & Baligar, V. (2015). Concentration of cadmium in cacao beans and its relationship with soil cadmium in southern Ecuador. *Science of the total environment*, 533, 205-214.
- Chavez, E., He, Z. L., Stoffella, P. J., Mylavarapu, R. S., Li, Y. C., & 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. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.013>
- Dahiya, S., Karpe, R., Hegde, A., & Sharma, R. (2005). Lead, cadmium and nickel in chocolates and candies from suburban areas of Mumbai, India. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(6), 517-522.
- Durán Ramírez, F., & Ramírez, F. D. (2010). Cultivo y explotación del cacao. Ecuador, M. d. C. E. d. (2013). Consultado 12 Nov.

- Echeverry, A., & Reyes, H. (2016). Determinación de la concentración de cadmio en un chocolate colombiano con 65% de cacao y chocolates extranjeros con diferentes porcentajes de cacao. *Entre Ciencia e Ingeniería*(19), 22-32.
- Enrique, D., Surendra, S., & Arnaldo, G. (2011). Score test para el efecto del coeficiente de solapamiento en modelos de superficies de respuesta de primer y segundo orden. *Dyna*, 78(165), 234-245.
- estrucplan. (2009). Metales pesados y su toxicología. estrucplan Farmaceutico., B. p. p. I. N. d. c. (2002). Validación de métodos analíticos. Retrieved from
- Farmer, J. (1993). Atomic absorption spectrometry. Theory, design and applications:(Edited by SJ HASWELL). *Analytical Spectroscopy Library*, Vol. 5. Elsevier, Amsterdam (1991) pp. xx+ 529. Price Dfl 345. ISBN 0-444-88217-0: Elsevier.
- Fedecacao. (2017). Producción de cacao en Colombia. Retrieved from
- Futalan, C. M., Kan, C.-C., Dalida, M. L., Pascua, C., & Wan, M.-W. (2011). Fixed-bed column studies on the removal of copper using chitosan immobilized on bentonite. *Carbohydrate Polymers*, 83(2), 697-704.
- Genny Rocío Martínez, C. P. (2010). Determinación de metales pesados, cadmio y plomo en suelos y granos de cacao frescos y fermentados mediante espectroscopía de adsorción atómica. (Investigativa), Universidad Industrial de Santander
- Gilces Vera, H. A., & Sanmartín Fajardo, F. M. (2013). Análisis y selección de proceso de secado de cacao y diseño de prototipo de una unidad secadora tipo plataforma.
- Ginebra. (1991). Manual de productos básicos-Cacao fino de aroma. Estudio de la producción y el comercio mundial. Centro de comercio interno.
- Gomis Yagües, V. (2008). Tema 1. Introducción a las técnicas instrumentales en el análisis industrial. *Técnicas Instrumentales en el Análisis Industrial*.
- Gramlich, A., Tandy, S., Andres, C., Chincheros Paniagua, J., Armengot, L., Schneider, M., & 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. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.014
- Green, J. M. (1996). Peer reviewed: a practical guide to analytical method validation. *Analytical chemistry*, 68(9), 305A-309A.
- Gunaraj, V., & Murugan, N. (1999). Application of response surface methodology for predicting weld bead quality in submerged arc welding of pipes. *Journal of Materials Processing Technology*, 88(1), 266-275.
- Guthrie, B., Beauchamp, J., Buettner, A., & Lavine, B. K. (2015). Preface *The Chemical Sensory Informatics of Food: Measurement, Analysis, Integration* (pp. xi-xv): ACS Publications.
- He, Q., & Singh, B. (1994). Crop uptake of cadmium from phosphorus fertilizers: I. Yield and cadmium content. *Water, Air, & Soil Pollution*, 74(3), 251-265.
- Hernandez, A. R. (2009). *Química Analítica EMC=COSMOS*.
- Hill, S. J., & Fisher, A. S. (2017). *Atomic Absorption, Methods and Instrumentation*. 37-43. doi:10.1016/b978-0-12-803224-4.00099-6
- Huamaní-Yupanqui, H. A., Mansilla-Minaya, L. G., Florida-Rofner, N., & Neira-Trujillo, G. M. (2012). Presence of heavy metals in organic cacao (*Theobroma cacao* L.) crop. *Acta Agronómica*, 61(4), 339-344.
- Hugo Alfredo Huamaní-Yupanqui, M. A. H.-R., Luis Germán Mansilla-Minaya, Nelino Florida-Rofner, Gilmer Milton Neira-Trujillo. (2012). Presencia de metales pesados en cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) orgánico Universidad Nacional de Colombia 61.

- Inforegión. (2013). Exportarán cacao de Tocache a Estados Unidos y Suiza.
- Innovvita. (2014). Metales Pesados. In M. Pesados (Ed.).
- Invima. (2015). Programa nacional de vigilancia y control de cadmio en Colombia productos derivados del cacao (Licor de cacao, chocolate de mesa, cocoa en polvo y chocolatina de leche). Retrieved from https://www.invima.gov.co/images/pdf/inspeccion_y_vigilancia/direccion-alimentos/subsectoriales/Documento-tecnico-Cadmio-en-cacao.pdf
- Jairo García Loazno, L. A. O., Mandius Romero Carrascal. (2005). Cap 3. Producción y zonas de producción. Evaluación edafoclimáticas de las tierras del trópico bajo colombiano para el cultivo de Cacao. Corpoica.
- Jiménez Tobón, C. S. (2015). Estado legal mundial del cadmio en cacao (*Theobroma cacao*): fantasía o realidad. *Producción+ Limpia*, 10(1), 89-104.
- Kirkham, M. B. (2006). Cadmium in plants on polluted soils: Effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments. *Geoderma*, 137(1), 19-32. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2006.08.024>
- L., W. F. (2017). Metodología analítica-Análisis instrumental. Ebah.
- Lanza, J. G., Churión, P. C., Liendo, N. J., & López, V. H. (2016). Evaluación del contenido de metales pesados en cacao (*teobroma cacao* L.) de santa bárbara del Zulia, Venezuela. *SABER. Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente*, 28(1).
- Lee, C., & Low, K. (1985). Determination of cadmium, lead, copper and arsenic in raw cocoa, semifinished and finished chocolate products. *Pertanika*, 8(2), 243-248.
- Lenntech. (2017). Metales pesados
- Madeddu, R. B. G. (2005). Estudio de la influencia del cadmio sobre el medioambiente y el organismo humano: perspectivas experimentales, epidemiológicas y morfofuncionales en el hombre y en los animales de experimentación.
- Manton, W. I. (2013). *Nonnutritive Constituents in Chocolate and Cocoa Chocolate in Health and Nutrition* (pp. 73-87): Springer.
- maps, G. (2017). Ubicación procedencias de muestras de cacao.
- Martín, M. I. A. (2005). El Cacao y el Chocolate, origen historia, árbol del cacao.
- McLaughlin, M. J., & Singh, B. R. (1999). Cadmium in soils and plants *Cadmium in soils and plants* (pp. 1-9): Springer.
- Mendoza, R., & Monserrate, F. (2010). Propuesta de creación del museo del cacao en Guayaquil.
- Mounicou, S., Szpunar, J., Andrey, D., Blake, C., & Lobinski, R. (2003). Concentrations and bioavailability of cadmium and lead in cocoa powder and related products. *Food Additives & Contaminants*, 20(4), 343-352.
- Mounicou, S., Szpunar, J., Lobinski, R., Andrey, D., & Blake, C.-J. (2002). Bioavailability of cadmium and lead in cocoa: comparison of extraction procedures prior to size-exclusion fast-flow liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection (SEC-ICP-MS). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 17(8), 880-886.
- Munoz Sierra, J. D., Camargo Trillos, D. A., & Gallego Suarez, D. (2009). Response surface methodology application in a CO₂ absorption process from biogas into an alkaline solution. *Dyna*, 76(159), 135-144.
- Niño Bernal, 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.

- Ofertia. (2016). Países que más consumen chocolate en el mundo. Retrieved from <http://esenciadechocolateycacao.com/paises-que-mas-consumen-chocolate-en-el-mundo>
- Ortega, Y. K. P. (2012). Incursión y posicionamiento del cacao Colombiano en el mercado Norteamericano.
- Ortiz, J., Palma, R., & Peñaranda, S. (2004). Validación del método de filtración por membrana utilizando caldo M-coliblu para la determinación simultánea de coliformes y E coli en aguas consumo humano. Bogotá. Instituto Nacional de Salud.
- Parra, Y. (2017). ¿Cómo Cultivar El Cacao? 5 Etapas, Manejo Y Ventajas De La Poda.
- Peña, E. (2008). Técnicas instrumentales.
- Pérez, G. (2013). Adsorción y emisión atómica. Retrieved from <http://www.qo.fcen.uba.ar/quimor/wp-content/uploads/Teorica%2016-8%20Absorci%C3%B3n%20y%20emisi%C3%B3n%20at%C3%B3mica.pdf>
- Pinzás, J. L. V. (2016). Contenido de cadmio en el cacao. Naturaleza interior.
- Pozo Acosta, J. C. (2013). La promesa de compraventa de bienes inmuebles en la Legislación Ecuatoriana. Quito: Universidad de las Américas, 2013.
- Prugarová, A., & Kováč, M. (1987). Lead and cadmium content in cocoa beans. *Molecular Nutrition & Food Research*, 31(5-6), 635-644.
- químicos, L. n. d. r. p. l. d. d. r. (2012). Análisis de elementos para categorías de ensayo NT-18 Mediante técnicas de espectroscopía atómica o espectroscopía de masas. Retrieved from
- Rasmilic, B. (2015). Espectroscopia de absorcion atomica. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab482s/AB482S04.htm>
- Rehman, S., & Husnain, S. M. (2012). Assessment of trace metal contents in chocolate samples by Atomic Absorption Spectrometry. *J. Trace Elem. Anal*, 1(1), 1-11.
- Richter, P. (2017). Validación de métodos analíticos.
- Rivera, S. V. B. (2013). Guía de métodos de detección y análisis de cadmio en cacao. Retrieved from
- Rueda Robayo, Y. L., Muñoz, C., & Angélica, M. (2015). Verificación del método determinación de demanda química de oxígeno en agua residual, en el laboratorio Multipropósito de Calarca SA ESP. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira.
- Ruiz Pacheco, J. A. (2015). Cacao y su aporte al desarrollo colombiano. Universidad Militar Nueva Granada.
- Sierra Pérez, D. C. (2017). El cacao como producto líder en la sustitución de cultivos ilícitos en el proceso de posconflicto. Universidad Militar Nueva Granada.
- Stoler, M. (2012). El justo sabor del cacao: Desafíos y ventajas del comercio justo del cacao. Universidad Andina Simón Bolívar, Sede Ecuador.
- Swisscontact. (2012). Desarrollo de la cadena del valor Cacao-Transformando el cultivo de Cacao en un negocio sostenible para pequeños agricultores
- Tamayo, I. M. (2015). Análisis de varianza con SPSS 8.0.
- Tarazón, A. S. (2004). Aplicación de la Metodología de Superficies de Respuesta para el Mejoramiento de la Calidad del Aceite de Soya. Universidad de Sonora
- Terrádez, M., & Juan, Á. A. (2003). Análisis de la varianza (ANOVA). ANOVA. Catalonia.
- Trelles, M. N. R. (2009). Evaluación de tecnologías para la fermentación de cacao. Universidad Estatal Amazonica.
- UMA, s. d. E. A. (2013). Espectrometría de Adsorción Atómica.
- Upload. (2015). Diseño central compuesto Retrieved from <https://documents.mx/documents/diseno-central-compuestos.html>

- Urrea Trujillo, A. I., Atehortúa Garcés, L., & Gallego Rúa, A. M. (2011). Regeneration through somatic embryogenesis of an elite colombian *Theobroma cacao* L. variety. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(2), 39-50.
- Vázquez Moreno, A. (2015). Validación de métodos analíticos.
- Velandia Castellanos, J. C. (2008). Validación del método analítico para la cuantificación de bacitracina en el laboratorio de control de calidad de una industria farmacéutica veterinaria.
- Waizel-Haiat, S., Waizel-Bucay, J., Magaña-Serrano, J. A., Campos-Bedoya, P., & San Esteban-Sosa, J. E. (2012). Cacao y chocolate: seducción y terapéutica. *An Med (Mex)*, 57(3), 236-245.
- Weights, I. B. o., & Measures. (1984). International vocabulary of basic and general terms in metrology: International organization for standardization.
- Welz, B., & Sperling, M. (2008). Atomic absorption spectrometry: John Wiley & Sons.