

Determinación de la concentración de cadmio en un chocolate colombiano con 65% de cacao y chocolates extranjeros con diferentes porcentajes de cacao¹

Determination of the concentration of cadmium in a Colombian chocolate with 65% of cocoa, and foreign chocolates with different cocoa percentages

Determinação da concentração de cádmio num chocolate colombiano com 65% de cacau e chocolates estrangeiros com diferentes porcentagens de cacau

A. Echeverry y H. Reyes

Recibido Agosto 25 de 2015 – Aceptado Febrero 19 de 2016

Resumen — se evaluó de forma cualitativa y cuantitativa la presencia de cadmio en un chocolate amargo con 65% de cacao producido en Colombia y en chocolates extranjeros con diferentes porcentajes de cacao. Para la preparación de las muestras se tomaron 0,5 gramos y se realizó una digestión ácida con ácido nítrico concentrado (HNO₃ 65%). La determinación del metal se llevó a cabo por medio de la técnica de espectrofotometría de absorción atómica de llama (FAAS). Se determinó el límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) del método, obteniéndose valores de 0,0309 mg/L y 0,0670 mg/L respectivamente. La concentración promedio de cadmio en el chocolate nacional fue de 4,0477 mg/kg, superando los límites establecidos por el Codex Alimentarius (2,0 mg/kg) y la Unión Europea (0,8 mg/kg).

Palabras clave — cadmio, chocolate amargo, espectrofotometría de absorción atómica, límite de detección, límite de cuantificación.

Abstract — the presence of cadmium was evaluated qualitatively and quantitatively in a dark chocolate with 65% cocoa produced in Colombia, and foreign chocolates with different percentages of cocoa. 0.5 grams were taken for the preparation of the samples, and an acid digestion with concentrated nitric acid (HNO₃ 65%) was performed. The metal determination was carried out by the Flame Atomic Absorption Spectrophotometry Technique (FAAS). The detection limit (LOD) and the quantification (LOQ) of the method was determined, obtaining values of 0.0309 mg/L and 0.0670 mg/L respectively. The average concentration of cadmium in the national chocolate was 4.0477 mg/kg, exceeding the limits established by the Codex Alimentarius (2,0 mg/kg) and the European Union (0,8 mg/kg).

Key words — cadmium, dark chocolate, atomic absorption spectrophotometry, detection limit, quantification limit.

Resumo – Se avaliou de forma qualitativa e quantitativa a presença de cádmio em um chocolate amargo com 65% de cacau produzido na Colômbia e em chocolates estrangeiros com diferentes porcentagens de cacau. Para a preparação das amostras foram tomadas 0,5 gramas y se realizou uma digestão ácida com ácido nítrico concentrado (HNO₃ 65%). A determinação do metal foi efetuada por meio da técnica de espectrofotometria de absorção atômica de chama (FAAS). Se determinou o limite de detecção (LOD) y quantificação (LOQ) do método, obtendo valores de 0,0309 mg/L e 0,0670 mg/L respectivamente. A concentração média de cadmio no chocolate nacional foi de 4,0477 mg/kg, superando os limites estabelecidos por o Codex Alimentarius (2,0 mg/kg) e a União Europeia (0,8 mg/kg).

¹Producto derivado del proyecto de investigación “Determinación cuantitativa y análisis de cadmio presente en chocolates colombianos con alto contenido de cacao”. Presentado por el Grupo de Investigación Grupo Químico de Investigación y Desarrollo Ambiental - QUIDEA, de la Universidad del Quindío.

H. Reyes docencia en el programa de Ingeniería de Alimentos, de la Universidad del Quindío, Armenia (Colombia); email: hreyes@uniquindio.edu.co.

A. Echeverry docencia en el programa de Ingeniería de Alimentos, de la Universidad del Quindío, Armenia (Colombia); email: aecheverry@uniquindio.edu.co.

Palavras chaves: cádmio, chocolate amargo, espectrofotometria de absorção atômica, limite de quantificação.

I. INTRODUCCIÓN

Chocolate es el producto homogéneo de materias de cacao, productos lácteos, azúcares y/o edulcorantes y otros aditivos alimentarios permitidos por la legislación. Al referirse a chocolate amargo, semidulce, oscuro, entre otros; este debe contener mínimo 35% de extracto seco total de cacao [1]. Las semillas de cacao proceden del árbol nombrado científicamente *Theobroma cacao L.*, las cuales tienen su significado griego como “alimento de los dioses”; es por ello que el chocolate ha sido conocido a través de la historia como un alimento exquisito al paladar humano [2].

La denominación preferente con la que se reconoce este producto alimenticio ha sido consecuencia no sólo de su inigualable sabor, sino también debido a sus múltiples beneficios para la salud de quienes lo consumen [3]. Entre sus principales ventajas se encuentra la alta fuente de antioxidantes [4], [5]. Los compuestos químicos presentes en el chocolate son las catequinas, epicatequinas y procianidinas hacen parte del grupo de los flavanoles [6], [7]. Es debido a estas estructuras fitoquímicas que el chocolate es un excelente aliado en la prevención de enfermedades cardiovasculares, principal causa de mortalidad en los países occidentales [6]. La manera cómo actúan en el organismo es limitando la inflamación de las vías sanguíneas, mejorando la dilatación vascular y la presión sanguínea y atenuando la actividad de las plaquetas, entre otros [8].

Además se ha demostrado que el chocolate tiene un balance benéfico del perfil lipídico [5]. Anteriormente este producto era visto como un alimento de un valor nutricional mínimo y muy poco saludable, debido a la cantidad de grasa saturada presente por naturaleza en el mismo conocida como manteca de cacao. Sin embargo, de manera particular se ha encontrado que el ácido esteárico (ácido graso saturado presente en la manteca de cacao en mayor proporción – 35%) tiene un comportamiento inusual, ya que no se comporta como saturado sino como insaturado, teniendo un efecto neutral en los niveles de colesterol de la sangre [9].

Por otro lado, se ha encontrado recientemente que los compuestos antioxidantes presentes en el chocolate, especialmente la epicatequina, no solo juegan un papel importante en la precaución de enfermedades cardiovasculares, sino que además tienen una acción neuroprotectora y neuromodulatoria en los humanos. Es decir, la primera acción se encuentra asociada a la prevención y disminución de enfermedades neurológicas, cognitivas y disminución funcional del cerebro como el Alzheimer, Parkinson y demencia senil. Y la segunda se relaciona con las habilidades de cognición, humor, aprendizaje y memoria [10].

Todo lo anteriormente mencionado ha hecho que el consumo del chocolate tenga una tendencia al aumento, según la Organización Internacional de Cacao (International Cocoa Organization - ICCO), en el periodo 2013-2014, siendo los países dominantes pertenecientes a Europa Occidental y Norte América [11].

La misma organización enfatiza que este crecimiento, aunque lento, se debe específicamente al cambio en el gusto de los consumidores. Pues los amantes del chocolate están exigiendo productos con mayor contenido de cacao, debido a que cada día se es más consciente de tener hábitos de vida saludables y por ende consumir alimentos que aporten a esta iniciativa, como lo es el chocolate por su alto contenido de antioxidantes [12]. Es por ello que la industria chocolatera responde de forma proactiva a esta preferencia produciendo cada vez más productos con alto contenido de cacao conocidos como chocolate oscuro, amargo o premium [11].

No obstante, los beneficios y atributos del chocolate pueden verse afectados por la presencia de trazas de metales pesados [13], [14]. El cadmio, considerado como contaminante alimentario [15], es un metal pesado tóxico ampliamente usado a nivel industrial en la producción de pintura, plástico, textil, vidrio, entre otros [16], lo que conlleva a que el metal se acumule progresivamente en el ambiente y se transporte fácilmente por medio del aire y del agua, llegando así a los suelos de los cultivos agrícolas y por ende a la cadena alimenticia [17], [18]. Otro factor que influye en la concentración de cadmio en las plantas es el uso de fertilizantes fosfatados [19], [20].

Las principales consecuencias toxicológicas del cadmio en el organismo son las enfermedades renales, pulmonares, digestivas, óseas y cancerígenas [21], [22], [23]. Es por ello que el objetivo del presente estudio fue determinar la concentración de cadmio en un chocolate colombiano con 65% de cacao y chocolates extranjeros con diferentes porcentajes de cacao, por medio de la técnica de espectrofotometría de absorción atómica de llama (FAAS).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Recolección de muestras

Como criterio de selección de las muestras se estableció que fueran chocolates de consumo directo y con alto porcentaje de cacao. Para tal fin se obtuvieron dos tipos de chocolates. Una marca comercial nacional y otras extranjeras. El chocolate producido en el país es amargo tipo exportación con 65% de cacao de 70 gramos. Se seleccionaron 5 lotes diferentes los cuales se recolectaron en las ciudades de Bogotá, Medellín, Cali y Armenia. Para un total de 14 muestras que se analizaron por triplicado.

Los chocolates extranjeros se obtuvieron de algunos países de Europa y con diferentes porcentajes de cacao como se muestra en la tabla I.

TABLA I
CHOCOLATES EXTRANJEROS

PAÍS	% CACAO	PESO NETO (g)
España	55	150
España	70	80
Francia	47	200
Francia	72	100
Francia	80	100
Suiza	49	100
Ghana	70	125

Para un total de 7 chocolates extranjeros los cuales se analizaron por triplicado.

B. Preparación de muestras

Para iniciar la preparación de las muestras se realizó una molienda y homogenización de las mismas con un molino manual, con el fin de evitar que el chocolate se derritiera, luego se almacenaron en un desecador por 72 horas con el objeto de equilibrar la humedad. Pasadas las 72 horas se pesaron 0,5 gramos de cada una en unos vasos digestores previamente lavados con ácido nítrico 65% (HNO₃). Posteriormente se adicionaron 7ml HNO₃ 65% marca MERCK para comenzar la digestión ácida, la cual además de realizar una descomposición de la materia orgánica forma una sal soluble del metal. Esta digestión se llevó a cabo en un horno digestor por microondas, usando el método de trampa de temperatura, donde la máxima temperatura alcanzada fue de 180°C y un tiempo de 35 minutos. Después de realizada la descomposición se adicionaron 2ml de peróxido de hidrogeno (H₂O₂) marca MERCK a cada muestra, con el fin de eliminar el color marrón resultante de la descomposición y así volverlas traslucidas, para luego ser aforadas con agua desionizada de un sistema Merck Millipore hasta 25ml [24].

Finalmente se realizó la determinación de cadmio por medio de la técnica de espectrofotometría de absorción atómica por llama. En total se analizaron 63 muestras incluyendo los triplicados.

C. Instrumentación

Para la digestión ácida se usó un horno digestor microondas marca CEM. Modelo MARS Xpress. Se trabajó con 24 vasos digestores y un método de trampa de temperatura que se muestra en la tabla II.

TABLA II.
MÉTODO DE TRAMPA DE TEMPERATURA USADO EN EL EQUIPO DIGESTOR POR MICROONDAS

Estado	Voltaje máximo	Potencia	Rampa de tiempo	Control de temperatura	Tiempo de sostenimiento
1	400 W	50%	10:00	100 °C	10:00
2	400 W	50%	10:00	180 °C	10:00
Enfriamiento: 15:00					

chocolate se realizó en un equipo espectrofotómetro de absorción atómica marca SHIMADZU. Modelo AA-7000. Las condiciones del método fueron: Longitud de onda: 228,8 nm, ancho de banda: 0,7 nm, flujo de gas: 1,8 L/min, altura de la celda: 10,5 mm, tipo de llama: aire - acetileno. Se tomó un estándar de Cadmio de 1000 ppm con el fin de elaborar una curva de calibración de 9 puntos con las siguientes concentraciones: blanco – 0,1 – 0,2 – 0,3 – 0,4 – 0,5 – 0,6 – 0,7 – 0,8 mg/L. Con esta se determinaron los límites de detección (LOD), cuantificación (LOQ) [25] y la concentración del metal.

III. RESULTADOS Y DISCUSIONES

A. Límite de detección y cuantificación

Para establecer los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) se realizaron lecturas seguidas del blanco como se muestra en la Tabla III, empleando agua desionizada y la curva de calibración (Fig. 1).

TABLA III
LECTURAS DEL BLANCO PARA LA DETERMINACIÓN DEL LOD Y LOQ

BLANCO	ABSORBANCIA
1	0,0012
2	0,0007
3	0,0002
4	0,0008
5	0,0022
6	0,0033
7	0,0014
8	0,0011
9	0,0005
10	0,0009

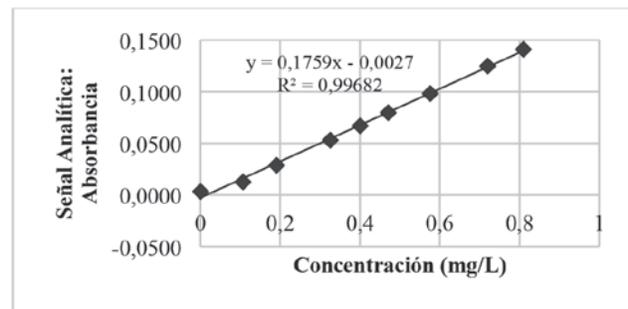


Fig 1. Curva de calibración de cadmio para la determinación en chocolates.

El límite de detección se calculó multiplicando 3 veces la desviación estándar de las absorbancias del blanco (σ), luego con los valores de la ecuación de la curva se estableció la concentración límite correspondiente al LOD. Para el límite de cuantificación se realizó el mismo procedimiento simplemente multiplicando por 10 la desviación estándar,

luego con la ecuación de la recta se determinaron las concentraciones para cada uno de los límites, como se muestra en las ecuaciones de la (1) – (5) [25]. Los resultados se muestran en la tabla IV.

$$LOD = 3\sigma_{blanco} \quad (1)$$

$$LOQ = 10\sigma_{blanco} \quad (2)$$

donde σ es la desviación estándar de las lecturas del blanco

$$y = mx + b \quad (3)$$

donde y es la señal analítica, es decir la absorbancia, m es la pendiente de la curva, x la concentración de cadmio en mg/L y b el intersepto de la curva

$$\text{Concentración LOD} = \frac{LOD-b}{m} \quad (4)$$

$$\text{Concentración LOQ} = \frac{LOQ-b}{m} \quad (5)$$

TABLA IV
RESULTADOS LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Desviación Estándar σ	0,0009
LOD	0,0027
LOQ	0,0091
M	0,1759
B	-0,0027
Concentración LOD	0,0309 mg/L
Concentración LOQ	0,0670 mg/L

El límite de detección indica la concentración a la cual se puede afirmar que hay presencia del metal en los chocolates analizados. Por su parte el límite de cuantificación es el valor en el cual se pueden realizar análisis cuantitativos, es decir, si las concentraciones obtenidas en el equipo superan el LOD y el LOQ se puede garantizar la confiabilidad del método. Sin embargo si la concentración de cadmio da por debajo del LOD se dice que es no detectable (ND), y si da en medio de los dos se afirma que es detectable, mas no cuantificable (NQ) [26].

B. Determinación de cadmio en los chocolates nacionales y extranjeros

Los resultados obtenidos, de la concentración de cadmio en los chocolates nacionales y extranjeros, se muestran en las tablas V y IV respectivamente. En cuanto a la nomenclatura de los chocolates nacionales la letra L indica el número de lotes (L1, L2, L3, L4, L5) las letras de la A a la D indican el número de chocolates por cada lote y los números que acompañan las letras indican los triplicados (A1, A2, A3). Así por ejemplo el nombre L1A1 corresponde al primer triplicado del primer chocolate del primer lote. Por su parte, en los chocolates extranjeros (tabla IV) el nombre simplemente muestra el país de origen y el porcentaje de cacao, por ejemplo, ESP1 55%, se refiere al primer triplicado del chocolate de España con 55% de cacao.

Para entender los resultados de las tablas V y VI es importante aclarar que la primera concentración (columna 4), es la que determina el equipo automáticamente por medio de la ley de Beer-Lamber, con la curva de calibración y los valores de absorbancia. Esta concentración es la que deben superar los límites de detección y cuantificación para verificar la confiabilidad del método. Como se puede notar en la tabla V para el chocolate nacional todas las muestras superaron el LOQ (0,0670 mg/L) excepto la L5A2, sin embargo el valor estuvo muy cercano (0,0641 mg/L) y los triplicados de esa muestra arrojaron valores positivos. Este resultado es muy positivo, ya que da la certeza de que estos valores son confiables para realizar análisis cuantitativos de la cantidad de cadmio presente en los chocolates. No obstante, en cuanto a los chocolates extranjeros (tabla VI), se puede ver que aunque todos superaron el LOD (0,0309 mg/L) excepto FRC3 72%, ninguno superó LOQ. Esto quiere decir que se puede afirmar con certeza la presencia de cadmio en este tipo de chocolates, más no es posible realizar análisis cuantitativos.

Por otro lado, el porcentaje de variabilidad (RSD) mostrado en la columna 6 indica, como su nombre lo dice, la variabilidad de los valores de absorbancia (señal analítica) de las muestras con respecto al ruido de fondo del método, dado que el equipo realiza un triplicado por cada lectura y luego promedia los valores de las tres mediciones. Para los chocolates nacionales el valor de RSD más alto fue de 13,80% y el más bajo de 0,00%, siendo este un porcentaje pequeño y da entender que la señal analítica está alejada del ruido de fondo, lo que se confirma nuevamente con los resultados obtenidos por encima del límite de detección y cuantificación. No obstante, para los chocolates extranjeros el porcentaje RSD fue muy alto, llegando a valores hasta de 115, 71% esto debido a la baja concentración de cadmio en este tipo de chocolates, lo que impidió que la señal analítica se alejara del ruido de fondo y por tal motivo se obtuvo una alta variabilidad. Este resultado se confirma con el hecho que ningún chocolate extranjero superó el límite de cuantificación.

Finalmente, para determinar la concentración real (columna 7) se realizó la conversión teniendo en cuenta el peso de la muestra (0,5 g) y el volumen al cual se aforó después de la digestión, el cual fue de 25ml, como se muestra en la ecuación (6).

$$\text{Con real} = \frac{(\text{con analítica} * \text{vol muestra})}{\text{peso muestra}} \quad (6)$$

Como ejemplo para la muestra L1A1 se calculó de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} \text{Con real L1A1} &= \frac{(0,0813 \frac{\text{mg}}{\text{L}} * 0,025\text{L})}{5,001 \times 10^{-4} \text{kg}} \\ &= 4,0642 \text{ mg/kg} \end{aligned}$$

TABLA V.
 RESULTADOS CONCENTRACIÓN DE CADMIO EN CHOCOLATE COLOMBIANO CON 65% DE CACAO

NÚMERO DE MUESTRAS	NOMBRE	W MUESTRA (g)	CONCENTRACIÓN (mg/L)	ABORBANCIA	%RSD	CONCENTRACIÓN REAL (mg/Kg)	LOQ=0,067
1	L1A1	0,5001	0,0813	0,0073	3,87	4,0642	OK
2	L1A2	0,4999	0,0773	0,0064	7,67	3,8658	OK
3	L1A3	0,5000	0,0706	0,0049	5,77	3,5300	OK
4	L1B1	0,5000	0,0746	0,0058	2,44	3,7300	OK
5	L1B2	0,4999	0,0906	0,0094	6,81	4,5309	OK
6	L1B3	0,4999	0,0724	0,0053	8,00	3,6207	OK
7	L1C1	0,5000	0,0844	0,0080	0,88	4,2200	OK
8	L1C2	0,5000	0,0728	0,0054	7,86	3,6400	OK
9	L1C3	0,4999	0,0826	0,0076	0,94	4,1308	OK
10	L1D1	0,5000	0,0831	0,0077	1,84	4,1550	OK
11	L1D2	0,4999	0,0693	0,0046	1,55	3,4657	OK
12	L1D3	0,5001	0,0786	0,0067	2,11	3,9292	OK
13	L2A1	0,5002	0,0880	0,0088	7,27	4,3982	OK
14	L2A2	0,4999	0,0835	0,0078	2,70	4,1758	OK
15	L2A3	0,4999	0,0755	0,0060	1,19	3,7758	OK
16	L2B1	0,5001	0,0857	0,0083	3,41	4,2841	OK
17	L2B2	0,5000	0,0817	0,0074	0,96	4,0850	OK
18	L2B3	0,4999	0,0849	0,0081	3,41	4,2458	OK
19	L3A1	0,4999	0,0921	0,0072	4,88	4,6059	OK
20	L3A2	0,4999	0,0781	0,0041	13,80	3,9058	OK
21	L3A3	0,5001	0,0858	0,0058	6,04	4,2891	OK
22	L3B1	0,5000	0,0859	0,0098	1,44	4,2950	OK
23	L3B2	0,5000	0,0744	0,0072	1,96	3,7200	OK
24	L3B3	0,5004	0,0868	0,0100	2,83	4,3365	OK
25	L3C1	0,5002	0,0892	0,0038	1,55	4,4582	OK
26	L3C2	0,5000	0,0709	0,0050	2,83	3,5450	OK
27	L3C3	0,5003	0,0869	0,0086	0,83	4,3424	OK
28	L3D1	0,4999	0,0849	0,0056	5,05	4,2458	OK
29	L3D2	0,5002	0,0740	0,0032	2,18	3,6985	OK
30	L3D3	0,4999	0,0967	0,0070	10,35	4,8360	OK
31	L4A1	0,5001	0,0909	0,0107	3,97	4,5441	OK
32	L4A2	0,5001	0,0742	0,0072	0,99	3,7093	OK
33	L4A3	0,5001	0,0785	0,0081	0,00	3,9242	OK
34	L4B1	0,4999	0,0814	0,0087	3,25	4,0708	OK
35	L4B2	0,5000	0,0881	0,0101	2,80	4,4050	OK
36	L4B3	0,5001	0,0924	0,0110	1,29	4,6191	OK
37	L5A1	0,5000	0,0699	0,0063	4,49	3,4950	OK
38	L5A2	0,5000	0,0641	0,0051	2,77	3,2050	NQ
39	L5A3	0,5001	0,0727	0,0069	2,05	3,6343	OK
40	L5B1	0,5003	0,0798	0,0069	0,00	3,9876	OK
41	L5B2	0,5003	0,0848	0,0080	1,77	4,2375	OK
42	L5B3	0,5003	0,0905	0,0094	0,75	4,5223	OK
media						4,0477	

TABLA VI.
RESULTADOS CONCENTRACIÓN DE CADMIO EN CHOCOLATES EXTRANJEROS

NÚMERO DE MUESTRAS	MUESTRA	W MUESTRA (g)	CONCENTRACIÓN (mg/L)	ABORBANCIA	%RSD	CONCENTRACIÓN REAL (mg/Kg)	LOD =0,0309	LOQ =0,067
1	ESP1 55%	0,5001	0,0562	0,0017	16,64	2,8094	OK	NQ
2	ESP2 55%	0,4999	0,0513	0,0006	90,00	2,5655	OK	NQ
3	ESP3 55%	0,5003	0,0513	0,0006	115,71	2,5635	OK	NQ
4	FRC1 47%	0,5001	0,0556	0,0020	3,45	2,7794	OK	NQ
5	FRC2 47%	0,4999	0,0551	0,0019	14,89	2,7556	OK	NQ
6	FRC3 47%	0,5000	0,0549	0,0014	29,19	2,7450	OK	NQ
7	ESP1 70%	0,5000	0,0600	0,0079	17,90	3,0000	OK	NQ
8	ESP2 70%	0,4999	0,0403	0,0040	3,54	2,0154	OK	NQ
9	ESP3 70%	0,5002	0,0630	0,0085	1,66	3,1487	OK	NQ
10	GHA1 70%	0,5003	0,0348	0,0029	4,88	1,7390	OK	NQ
11	GHA2 70%	0,4998	0,0584	0,0076	4,68	2,9212	OK	NQ
12	GHA3 70%	0,4999	0,0363	0,0032	4,92	1,8154	OK	NQ
13	FRC1 80%	0,5000	0,0584	0,0076	6,47	2,9200	OK	NQ
14	FRC2 80%	0,5001	0,0564	0,0072	7,86	2,8194	OK	NQ
15	FRC3 80%	0,5000	0,0534	0,0066	3,19	2,6700	OK	NQ
16	FRC1 72%	0,4999	0,0338	0,0027	15,71	1,6903	OK	NQ
17	FRC2 72%	0,5002	0,0333	0,0026	8,32	1,6643	OK	NQ
18	FRC3 72%	0,5000	0,0281	0,0016	8,84	1,4050	ND	NQ
19	SUZ1 49%	0,5001	0,0469	-0,0004	20,20	2,3445	OK	NQ
20	SUZ2 49%	0,5000	0,0554	0,0015	9,43	2,7700	OK	NQ
21	SUZ3 49%	0,5001	0,0585	0,0022	9,87	2,9244	OK	NQ
media						2,4793		

Para las muestras de chocolate colombiano el promedio de la concentración real de cadmio fue de 4,0477 mg de cadmio / kg de chocolate. Siendo este resultado un valor muy alto ya que sobrepasa los límites máximos establecidos por el Codex Alimentarius y la Unión Europea los cuales son de 2 mg/kg y 0,8 mg/kg respectivamente, para chocolates con más del 50% de cacao [27], [28], como es el caso del chocolate nacional analizado (65%). Estos resultados deben poner en alerta a la industria chocolatera, debido a la alta toxicidad del metal [29].

Por su parte, para los chocolates extranjeros el promedio de la concentración de cadmio fue de 2,3962 mg de cadmio / kg de chocolate, a pesar que este valor supera los límites establecidos por las legislación nombradas, no se puede afirmar con certeza la veracidad de este resultado ya que se analizaron chocolates con diferentes porcentajes de cacao, lo que hace que sean resultados diferentes, debido a que el cadmio procede de los granos de cacao y no de los demás ingredientes adicionados al chocolate [13], [30].

C. Diseño experimental de chocolate colombiano

Los resultados obtenidos para el chocolate colombiano se sometieron a un análisis estadístico con el fin de establecer si había una diferencia significativa en cuanto a la concentración de cadmio en los diferentes lotes. La

comparación se hizo mediante la técnica ANOVA por medio del programa estadístico PASW Statistics 18.

Se planteó la hipótesis nula y la hipótesis alterna que se muestran a continuación con un nivel de significancia de $\alpha=0,05$.

H₀: $\mu_0 = \mu_k$ (la concentración de cadmio de todos los lotes de chocolate es igual)

H_i: $\mu_0 \neq \mu_i$ (al menos una de las concentraciones de cadmio de un lote es diferente)

1) Análisis univariable – ANOVA

En la tabla VII se muestra el número de chocolates analizados por cada lote con la media y desviación estándar de la concentración de cadmio. Estas mismas medias fueron graficadas en la Fig. 2. La interpretación es que los lotes son estadísticamente iguales, ya que el valor p arrojado fue de 0,152, siendo mayor que el nivel de significancia elegido ($\alpha=0,05$), como se muestra en la tabla VIII. Esto quiere decir que no hay diferencias significativas entre las concentraciones de cadmio en los diferentes lotes, lo que se confirma con los diagramas de dispersión y de caja y bigotes representados en las Fig. 3 y 4, debido a que presentan una distribución normal de los datos.

TABLA VII
ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS DE LA CONCENTRACIÓN DE CADMIO
EN CADA LOTE

LOTE	Media	Desviación típica	N
LOTE 1	3,906858	,3229372	12
LOTE 2	4,160783	,2158621	6
LOTE 3	4,189850	,3919803	12
LOTE 4	4,212083	,3657167	6
LOTE 5	3,846950	,4918532	6
Total	4,059033	,3794866	42

TABLA VIII
PRUEBAS DE LOS EFECTOS INTER-SUJETOS

Origen	Suma de cuadrados tipo III	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
LOTE	,956	4	,239	1,787	,152
Error	4,949	37	,134		
Total corregida	5,904	41			

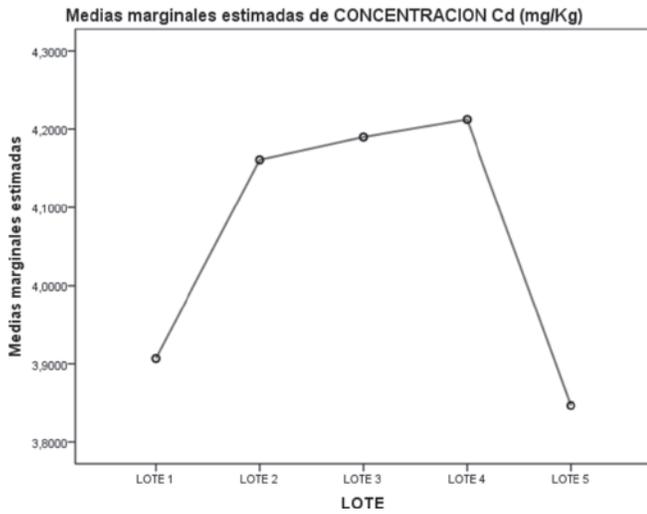


Fig. 2. Gráfico de la media de concentración de cadmio por cada lote de chocolate.

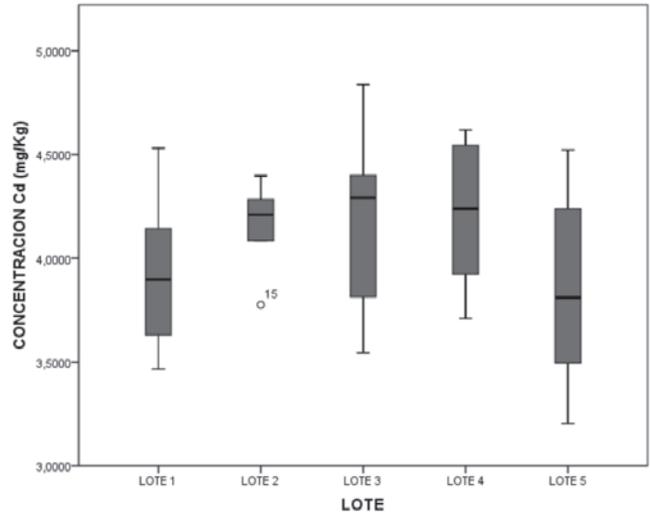


Fig. 4. Gráfico caja y bigotes de la concentración de cadmio en los lotes de chocolate.

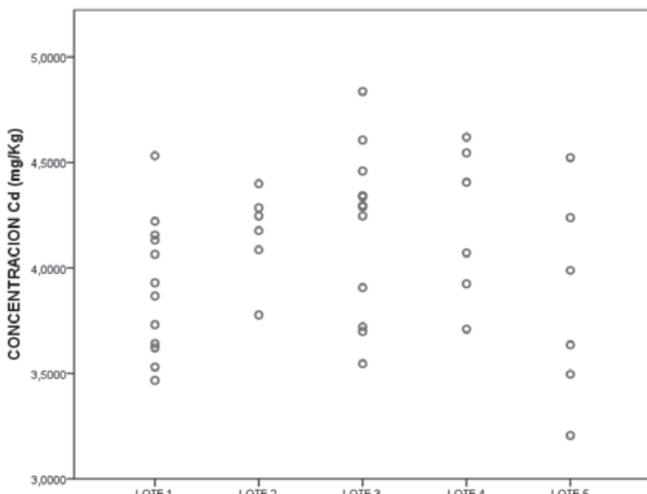


Fig. 3. Gráfico de dispersión de la concentración de cadmio en los lotes de chocolate.

En el gráfico de caja y bigotes (Fig. 4) el único dato atípico que muestra es el número 15 ya que en el lote 2 todas las concentraciones de cadmio estuvieron por encima de 4 mg/kg y esta fue de 3,77. Sin embargo esto no tiene ninguna interferencia en cuanto a la interpretación estadística de los datos.

2) Comparaciones múltiples

En cuanto a los análisis de comparación múltiple, las pruebas de Tukey y Fisher (tabla IX), las cuales relacionan cada lote con respecto al otro, demuestran nuevamente que no se encuentra diferencia significativa entre las concentraciones de cadmio, debido a que el valor p de cada uno es mayor que el nivel de significancia. Por otro lado la prueba de Duncan (tabla X) evidencia el mismo resultado, puesto que agrupa todos los lotes de chocolate en un mismo subconjunto.

TABLA IX
PRUEBAS DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE TUKEY Y FISHER

Variable dependiente: CONCENTRACIÓN Cd (mg/Kg)							
	(I)LOTE	(J)LOTE	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
						Límite inferior	Límite superior
DHS de Tukey	LOTE 1	LOTE 2	-,253925	,1828570	,639	-,778146	,270296
		LOTE 3	-,282992	,1493021	,338	-,711017	,145033
		LOTE 4	-,305225	,1828570	,465	-,829446	,218996
		LOTE 5	,059908	,1828570	,997	-,464313	,584130
	LOTE 2	LOTE 1	,253925	,1828570	,639	-,270296	,778146
		LOTE 3	-,029067	,1828570	1,000	-,553288	,495155
		LOTE 4	-,051300	,2111451	,999	-,656619	,554019
		LOTE 5	,313833	,2111451	,578	-,291485	,919152
	LOTE 3	LOTE 1	,282992	,1493021	,338	-,145033	,711017
		LOTE 2	,029067	,1828570	1,000	-,495155	,553288
		LOTE 4	-,022233	,1828570	1,000	-,546455	,501988
		LOTE 5	,342900	,1828570	,348	-,181321	,867121
	LOTE 4	LOTE 1	,305225	,1828570	,465	-,218996	,829446
		LOTE 2	,051300	,2111451	,999	-,554019	,656619
		LOTE 3	,022233	,1828570	1,000	-,501988	,546455
		LOTE 5	,365133	,2111451	,429	-,240185	,970452
	LOTE 5	LOTE 1	-,059908	,1828570	,997	-,584130	,464313
		LOTE 2	-,313833	,2111451	,578	-,919152	,291485
		LOTE 3	-,342900	,1828570	,348	-,867121	,181321
		LOTE 4	-,365133	,2111451	,429	-,970452	,240185
DMS	LOTE 1	LOTE 2	-,253925	,1828570	,173	-,624429	,116579
		LOTE 3	-,282992	,1493021	,066	-,585507	,019523
		LOTE 4	-,305225	,1828570	,104	-,675729	,065279
		LOTE 5	,059908	,1828570	,745	-,310595	,430412
	LOTE 2	LOTE 1	,253925	,1828570	,173	-,116579	,624429
		LOTE 3	-,029067	,1828570	,875	-,399570	,341437
		LOTE 4	-,051300	,2111451	,809	-,479121	,376521
		LOTE 5	,313833	,2111451	,146	-,113987	,741654
	LOTE 3	LOTE 1	,282992	,1493021	,066	-,019523	,585507
		LOTE 2	,029067	,1828570	,875	-,341437	,399570
		LOTE 4	-,022233	,1828570	,904	-,392737	,348270
		LOTE 5	,342900	,1828570	,069	-,027604	,713404
LOTE 4	LOTE 1	,305225	,1828570	,104	-,065279	,675729	
	LOTE 2	,051300	,2111451	,809	-,376521	,479121	
	LOTE 3	,022233	,1828570	,904	-,348270	,392737	
	LOTE 5	,365133	,2111451	,092	-,062687	,792954	
LOTE 5	LOTE 1	-,059908	,1828570	,745	-,430412	,310595	
	LOTE 2	-,313833	,2111451	,146	-,741654	,113987	
	LOTE 3	-,342900	,1828570	,069	-,713404	,027604	
	LOTE 4	-,365133	,2111451	,092	-,792954	,062687	

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,134.

TABLA X.

PRUEBA DE DUNCAN DE SUBCONJUNTOS HOMOGÉNEOS
 VARIABLE DEPENDIENTE: CONCENTRACION Cd (mg/kg)

	LOTE	N	Subconjunto
			1
Duncan ^{a,b,c}	LOTE 5	6	3,846950
	LOTE 1	12	3,906858
	LOTE 2	6	4,160783
	LOTE 3	12	4,189850
	LOTE 4	6	4,212083
	Sig.		

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,134.

- a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 7,500
- b. Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleará la media armónica de los tamaños de los grupos. No se garantizan los niveles de error tipo I.
- c. Alfa=,05.

3) Verificación de supuestos

En cuanto a la verificación de supuestos se obtuvo una distribución normal de los residuales, debido a que en las pruebas de Kolmogorov y Shapiro Wilk (tabla XI) las dos arrojaron un valor p mayor que el nivel de significancia 0,05. Finalmente el último supuesto que se verificó fue el de homogeneidad de varianza (homocedasticidad), por medio de la prueba de levene (tabla XII) y el grafico de residuales (Fig. 6). Se comprobó que los datos son homocedasticos debido a que el valor p supera el nivel de significancia y el gráfico presenta el patrón normal de comportamiento.

Esto también se puede verificar con el grafico de normalidad (Fig. 5), el cual sigue el patrón establecido.

TABLA XI

PRUEBA DE NORMALIDAD DE RESIDUOS

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Residuo para CONCENTRACION	,097	42	,200	,971	42	,370
N						



Fig 5. Gráfico de normalidad de residuos.

TABLA XII

CONTRASTE DE LEVENE SOBRE LA IGUALDAD DE LAS VARIANZAS ERROR

F	gl1	gl2	Sig.
1,546	4	37	,209

Contrasta la hipótesis nula de que la varianza error de la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos

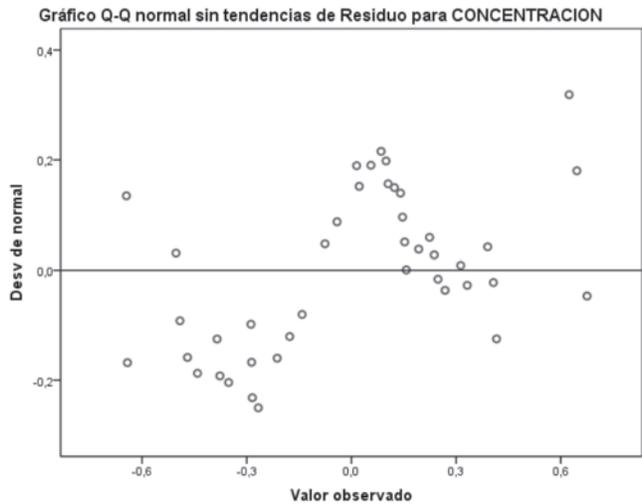


Fig 6. Gráfico de homocedasticidad de residuales.

IV. CONCLUSIONES

En el estudio realizado se lograron obtener resultados satisfactorios tanto para el chocolate nacional como para los extranjeros en cuanto a su contenido de cadmio, es decir, que en los tipos de muestras analizadas hay presencia del metal. En cuanto a las muestras del chocolate colombiano estas superaron los límites de detección y cuantificación, lo que permite afirmar con certeza, no sólo la presencia, sino también la cantidad de cadmio en los chocolates.

Por otro lado, la concentración promedio del metal se encuentra muy por encima de lo que exigen las normas internacionales como el Codex Alimentarius y la Unión Europea, lo que genera una gran preocupación debido a la alta toxicidad del cadmio. En cuanto al diseño experimental se puede concluir que no existe una diferencia significativa de la concentración del metal en los diferentes lotes, es decir, teniendo en cuenta que en total se analizaron 5 lotes con diferentes fechas de fabricación es posible asumir que todo el chocolate producido, de este tipo, presenta contaminación con cadmio.

Por su parte, en los chocolates extranjeros a pesar de que se verificó la presencia de cadmio; lo que genera la alerta que esta problemática no sólo se está presentando a nivel nacional sino en otros países como los europeos, siendo estos los más consumidores de chocolate en el mundo; los resultados obtenidos no permiten afirmar con certeza la cantidad del metal debido a que no superaron el límite de cuantificación, además tampoco fue posible realizar un diseño experimental debido a la variabilidad de los resultados, pues los chocolates obtenidos presentaban diferentes porcentajes de cacao.

Conociendo la toxicología del cadmio es importante que a partir de estos resultados y otros estudios realizados en el país se puedan comenzar a generar normas relacionadas con la cantidad del metal presente en los chocolates producidos en Colombia para así controlar el riesgo en la salud de los consumidores y comenzar a realizar cambios a nivel industrial con el fin de no perder los beneficios que genera el consumo de chocolate por su alto contenido de antioxidantes.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad del Quindío y a la Universidad de Santa Cruz del Sur – UNISC de Brasil por su contribución en el préstamo de los laboratorios, equipos y reactivos para el desarrollo del proyecto. De igual manera agradece a los profesores Adilson Ben da Costa y Rodolfo López por su asesoría y acompañamiento.

REFERENCIAS

- [1] *Codex Standard for Chocolate and Chocolate Products*. Norma CODEX STAN 87-1981, Rev. 1 – 2003. Codex Alimentarius. 2003.
- [2] L. Batista, *Guía técnica. El cultivo del cacao*. República Dominicana. Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal, Inc. 250p. 2009.
- [3] K. D. Monahan, “Effect of cocoa/chocolate ingestion on brachial artery flow-mediated dilation and its relevance to cardiovascular health and disease in humans.,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 527, no. 2, pp. 90–4, Nov. 2012.
- [4] W. A. Jonfia-Essien, G. West, P. G. Alderson, and G. Tucker, “Phenolic content and antioxidant capacity of hybrid variety cocoa beans,” *Food Chem.*, vol. 108, no. 3, pp. 1155–1159, Jun. 2008.
- [5] F. M. Steinberg, M. M. Bearden, and C. L. Keen, “Cocoa and chocolate flavonoids: implications for cardiovascular health.,” *J. Am. Diet. Assoc.*, vol. 103, no. 2, pp. 215–23, Feb. 2003.
- [6] L. Fernández-Murga, J. J. Tarín, M. a García-Perez, and a Cano, “The impact of chocolate on cardiovascular health.,” *Maturitas*, vol. 69, no. 4, pp. 312–21, Aug. 2011.
- [7] M. B. Engler and M. M. Engler, “The vasculoprotective effects of flavonoid-rich cocoa and chocolate,” *Nutr. Res.*, vol. 24, no. 9, pp. 695–706, Sep. 2004.
- [8] D. Grassi, G. Desideri, and C. Ferri, “Blood pressure and cardiovascular risk: what about cocoa and chocolate?,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 501, no. 1, pp. 112–5, Sep. 2010.
- [9] J. Mursu, S. Voutilainen, T. Nurmi, T. H. Rissanen, J. K. Virtanen, J. Kaikkonen, K. Nyyssönen, and J. T. Salonen, “Dark chocolate consumption increases HDL cholesterol concentration and chocolate fatty acids may inhibit lipid peroxidation in healthy humans.,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 37, no. 9, pp. 1351–9, Nov. 2004.
- [10] A. N. Sokolov, M. a Pavlova, S. Klosterhalfen, and P. Enck, “Chocolate and the brain: neurobiological impact of cocoa flavanols on cognition and behavior.,” *Neurosci. Biobehav. Rev.*, vol. 37, no. 10 Pt 2, pp. 2445–53, Dec. 2013.
- [11] International Cocoa Organization - ICCO. *The World Cocoa Economy: Past and Present*. 2012. Disponible: http://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat_view/30-related-documents/45-statistics-other-statistics.html. Consultado el 19 de diciembre de 2014.
- [12] F. A. Pimentel, J. A. Nitzke, C. B. Klipel, and E. V. De Jong, “Chocolate and red wine – A comparison between flavonoids content,” *Food Chem.*, vol. 120, no. 1, pp. 109–112, May 2010.
- [13] R. L. Yanus, H. Sela, E. J. C. Borjovich, Y. Zakon, M. Saphier, A. Nikolski, E. Gutflais, A. Lorber, and Z. Karpas, “Trace elements in cocoa solids and chocolate: an ICPMS study,” *Talanta*, vol. 119, pp. 1–4, Mar. 2014.
- [14] S. Rehman and S. M. Husnain, “Assessment of trace metal contents in chocolate samples by Atomic Absorption Spectrometry,” *J. Trace Elem. Anal.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–11, Oct. 2012.
- [15] *Norma general del codex para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos*. Norma CODEX STAN 193-1995. Codex Alimentarius. 1995.
- [16] M. Rodrigues, N. Martínez-de la Casa, M. C. Romero, L. A. del Rio, and L. M. Sandalio, “Toxicidad del Cadmio en Plantas,” *Ecosistemas. Rev. científica Ecol. y medio Ambient.*, vol. 17, no. 3, pp. 139–146, Apr. 2008.
- [17] A. Ramírez, “Toxicología del cadmio. Conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos,” *An. la Fac. Med. Univ. Nac. Mayor San Marcos*, vol. 63, no. 1, pp. 51–64, 2002.
- [18] M. P. Benavides, S. M. Gallego, and M. L. Tomaro, “Cadmium toxicity in plants,” *Toxic Met. Plants*, vol. 17, no. 1, pp. 21–34, 2005.
- [19] T. L. Roberts, “Cadmium and Phosphorous Fertilizers: The Issues and the Science,” *Procedia Eng.*, vol. 83, pp. 52–59, 2014.
- [20] C. A. Grant, “Influence of Phosphate Fertilizer on Cadmium in Agricultural Soils and Crops,” *Agric. Agri.Food Canada. Brand. Res. Cent.*, pp. 143–155, Feb. 2011.
- [21] L. Järup and A. Akesson, “Current status of cadmium as an environmental health problem.,” *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 238, no. 3, pp. 201–8, Aug. 2009.
- [22] M. Waalkes, “Cadmium carcinogenesis,” *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.*, vol. 533, no. 1–2, pp. 107–120, Dec. 2003.
- [23] International Agency for Research on Cancer - IARC. *Agency classified by the IARC monographs*. Vol. 1-111. 2012. Disponible: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>. Consultado el 7 de enero de 2014.
- [24] F. J. Krug, *Métodos preparo de amostras. Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar*, Primera edição. Brasil. F.J Krug., 340 f. 2010.
- [25] N. J. Miller, and J. C. Miller. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, Cuarta edición. Madrid. Pearson Educación S.A., 2002, 278 p.
- [26] L. Ebdon, E.H. Evans, A. S. Fisher, S. J. Hill. *An Introduction to Analytical Atomic Spectrometry*. John Wiley & Sons Ltd., 1998, 195 p.
- [27] *Proposed draft maximum levels for cadmium in chocolate and cocoa-derived products*. Norma CX/CF 15/9/6. Codex Alimentarius Commission. 2014. Join FAO/WHO Food Standards Programme Codex Committee on Contaminants in Food, Dec. 2014.
- [28] Amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of cadmium in foodstuffs. Norma Commission Regulation (EU) No 488/2014. European Union, May. 2014.

- [29] G. F. Nordberg, "Historical perspectives on cadmium toxicology," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 238, no. 3, pp. 192–200, Aug. 2009.
- [30] S. Dahiya, R. Karpe, a. G. Hegde, and R. M. Sharma, "Lead, cadmium and nickel in chocolates and candies from suburban areas of Mumbai, India," *J. Food Compos. Anal.*, vol. 18, no. 6, pp. 517–522, Sep. 2005.

Henry Reyes Pineda es ingeniero químico egresado de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Manizales con Especialización en Educación Ambiental, Especialización en Ingeniería Electroquímica y Corrosión, Diploma de Estudios Avanzados en Tecnologías de Membranas, Electroquímica y medio Ambiente Seguridad Nuclear y con un Doctorado en Ingeniería Química y Nuclear de la Universidad Politécnica de Valencia, España.

Actualmente es profesor de tiempo completo de la Universidad del Quindío, Armenia, Colombia y Decano de la Facultad de Ciencias Agroindustriales; hace parte del Grupo Químico en Investigación y Desarrollo Ambiental.

Ha sido docente de la Universidad de Caldas, Universidad Nacional, Universidad Católica de Pereira, Sede Manizales y Universidad Autónoma de Manizales. Entre sus áreas de trabajo investigativo se encuentran La Ingeniería Electroquímica, Los Procesos ambientales, el Tratamiento de residuos sólidos y líquidos, el Diseño de Reactores, entre otros.

El Doctor Reyes Pineda, se graduó en el 2007, obteniendo la máxima calificación en su Tesis Doctoral: "Cum Laude" Ha sido profesor visitante en tres oportunidades a la Universidad Politécnica de Valencia, España y en dos ocasiones a la Universidad de Santa Cruz del Sur, Brasil, desarrollando actividades académicas e investigativas. Igualmente ha participado como conferencista en diferentes congresos nacionales e internacionales.

Alejandra Echeverry Aranda es ingeniera de alimentos egresada de la Universidad de Antioquia, Sede Medellín con Maestría en Química de la Universidad del Quindío. El título de Magister lo obtuvo en el mes de mayo de 2015 con el reconocimiento de tesis meritorio al trabajo de grado titulado "Determinación cuantitativa y análisis de cadmio presente en chocolates colombianos con alto contenido de cacao".

Actualmente es profesora ocasional de tiempo completo de la Universidad del Quindío de la facultad de Ciencias Agroindustriales en el programa de Ingeniería de Alimentos, hace parte del Grupo Químico en Investigación y Desarrollo Ambiental.