

## Comparación estadística de métodos de extracción para determinar cadmio en granos de cacao

Johanna Sofía Utreras-Peñaflor<sup>1\*</sup>; Iván Luis Tapia-Calvopiña<sup>2</sup>;  
Luis Ramos-Guerrero<sup>3</sup>

(Recibido: enero 19, Aceptado: mayo 25, 2021)

<https://doi.org/10.29076/issn.2602-8360vol5iss8.2021pp62-71p>

### Resumen

El monitoreo de la concentración de cadmio en granos de cacao es indispensable debido al potencial efecto sobre la salud de los consumidores. Esta investigación tiene como objetivo desarrollar un método de extracción adecuado para la determinación de cadmio en granos de cacao mediante el uso de tres técnicas de extracción con digestión ácida de las muestras: I) HNO<sub>3</sub> concentrado, II) HNO<sub>3</sub>-HClO<sub>4</sub>, y III) HNO<sub>3</sub>-HCl (agua regia) y la posterior cuantificación de cadmio mediante espectrofotometría de absorción atómica en llama. El análisis de varianza de las concentraciones de cadmio obtenidos demostró que existe diferencia significativa entre los métodos de extracción aplicados y que la técnica III es la más eficiente para extraer el cadmio de los granos de cacao. Así mismo, se evaluaron varios parámetros de desempeño del método desarrollado como la veracidad (ensayos entre laboratorios), precisión (repetibilidad y reproducibilidad), linealidad, límite de cuantificación, límite de confianza, rango de trabajo, los cuales permitieron evidenciar que los resultados de cadmio obtenidos por el método desarrollado son exactos y adecuados para el propósito.

**Palabras Clave:** cadmio; contaminación de alimentos; desempeño del método; espectrofotometría de absorción atómica; granos de cacao; *Theobroma cacao* lineo.

## Statistical comparison of extraction methods to determine cadmium in cocoa beans

### Abstract

Monitoring the concentration of cadmium in cocoa beans is essential due to the potential effect on the health of consumers. This research aims to develop a suitable extraction method for the determination of cadmium in cocoa beans by using three extraction techniques with acidic digestion of the samples: I) Concentrated HNO<sub>3</sub>, II) HNO<sub>3</sub>-HClO<sub>4</sub> and III) HNO<sub>3</sub>-HCl and subsequent cadmium quantification by flame atomic absorption spectroscopy. The analysis of variance of the cadmium concentrations obtained showed that there is a significant difference between the extraction methods applied and that III one is the most efficient to extract cadmium from cocoa beans. Likewise, several performance parameters of the developed method were evaluated, such as precision (repeatability and intermediate precision), linearity, quantification limit, confidence limit, working range, which allowed to show that the cadmium results obtained by the developed method are reliable and fit for the purpose.

**Keywords:** cadmium; contamination of food; method performance; atomic absorption spectrophotometry; cocoa beans; *Theobroma cacao* lineo.

<sup>1</sup> Química de Alimentos, Maestrante Universidad Estatal de Milagro, UNEMI, Ecuador. Email: johaup612@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-6120-3202>

<sup>2</sup> MSc, Docente de la Universidad Central del Ecuador, Ecuador. Email: ivan\_tapia\_c@hotmail.com. <https://orcid.org/0000-0001-9305-4793>

<sup>3</sup> Dr. en Química, Investigador del Centro de Investigación de Alimentos - CIAL, Universidad Tecnológica Equinoccial, UTE, Ecuador. Email: luis.ramos@ute.edu.ec. <https://orcid.org/0000-0003-2654-3989>

\* Autor de correspondencia

## INTRODUCCIÓN

El Ecuador es el principal exportador de cacao fino de aroma del mundo, actualmente cubre más del 60% de este mercado [1] [2] y sus principales compradores son Indonesia, EEUU, Malasia, Holanda, México, Alemania, China, Bélgica, Canadá y Japón [3]. Sin embargo, las exportaciones de cacao fino de aroma del Ecuador, especialmente hacia los mercados europeos, se ve amenazado por el reglamento UE N° 488/2014 expedido el 12 de mayo del 2014, en el cuál se colocó límites al contenido de cadmio en productos elaborados con cacao. El cadmio es un metal pesado, cuya principal fuente de transferencia es el suelo; su presencia en los suelos agrícolas puede depender de varios factores ya sean geogénicos; es decir, que su presencia se da de forma natural debido a ceniza volcánica; o puede ser antropogénica, es decir, que su presencia en los suelos se da por incidencia humana ya sea por la utilización de fertilizantes y/o abonos enriquecidos en cadmio, minería o riego con agua contaminada. Muchos alimentos tienden a absorberlo y a retenerlo como es el caso de las plantas, entre las cuales se encuentra el cacao.

Tomando en cuenta que el Ecuador es uno de los mayores exportadores de cacao en el mundo y considerando la contaminación que el cadmio puede tener sobre los cultivos del mismo, la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario –AGROCALIDAD desde el año 2012 se encuentra realizando investigaciones sobre la presencia de cadmio en los granos de cacao, con las cuales se podrá determinar los niveles máximos de residuos (LMR's) de cadmio presente en el cacao nacional de exportación.

Por otro lado, ante la falta de un método estandarizado para la extracción de cadmio en almendras de cacao, se requiere el desarrollo de un método, el mismo que será utilizado en el laboratorio de bromatología de AGROCALIDAD.

En el 2019, la Normativa Europea establece que el LMR's para granos de cacao es de 0,6 a 1,2 mg Cd.Kg<sup>-1</sup>, estos límites aún se encuentran sujetos a cambio ya que ciertos países aún no norman la cantidad de cadmio presente en su cacao como materia prima. El Servicio Ecuatoriano de

Normalización (INEN), consciente de los efectos del cadmio en la salud y de la importancia que representa el cacao al país, realizó el proceso de certificación del “Material de Referencia de Cadmio, en polvo de almendra de Cacao”, con el cual se inicia la cadena de trazabilidad metrológica para garantizar que los laboratorios nacionales que realizan el ensayo, puedan avalar la calidad de sus mediciones y confirmar que cumplen especificaciones normativas reglamentarias y no sean objetables, con lo cual se brindará la confianza necesaria para la apertura de mercados internacionales. Además, técnicos del INEN ejecutaron un ensayo de aptitud LNM-EA-2019-01 “Determinación de cadmio en cacao” con laboratorios que realizan este ensayo, con lo cual estos validarán sus métodos de medición y optarán por la acreditación en caso de que así lo requieran [4].

## Antecedentes

Esta investigación tomó como base fundamental dos documentos, el primero titulado “Avances del monitoreo de presencia de cadmio en almendras de cacao, suelos y aguas en Ecuador” trabajo que fue efectuado por Francisco Mite, Manuel Carrillo y Wellings Durango en el 2009, del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) Estación Experimental Tropical Pichilingue Departamento Nacional de Manejo de Suelos y Aguas. Este trabajo aplica el método de digestión ácida con solución nítrica perclórica y digestión ácida con agua regia procedimientos que permitieron determinar niveles de cadmio en suelos y tejidos respectivamente [5]. El segundo documento en el que se basó este trabajo fue una investigación realizada por el Instituto Federal de Evaluación de Riesgos (BFR por sus siglas en alemán) en el 2011 titulado “El Instituto Federal de evaluación de Riesgos (BFR) propone el establecimiento de límites para el cadmio en los chocolates”, el cual indica que el Ministerio Federal de Alimentos, Agricultura y Protección al Consumidor (BMELV por sus siglas en alemán) pide al BFR que valore el riesgo respecto al tema de “cadmio en cacao y chocolate” [6]. Revisan los límites europeos de metales pesados en alimentos; y exponen que

el componente esencial del chocolate son los granos de cacao, los mismos que pueden tener diferentes cantidades de cadmio dependiendo del país de donde provengan.

### MARCO CONCEPTUAL

**Métodos Instrumentales.** Los métodos instrumentales se basan en la medida de propiedades físicas que pueden utilizarse como señales analíticas en el análisis cualitativo o cuantitativo, su uso ha aumentado con el desarrollo de la electrónica por la facilidad de detectar cambios en las propiedades físico-químicas y transformarlos a un lenguaje entendible por el ser humano. Existen varios tipos de métodos instrumentales, en la mayor parte de ellos se requiere de una fuente de energía para estimular una respuesta medible que procede del analito [7].

**Espectrofotometría.** La Espectrofotometría es el método de análisis que se basa en la medición de la radiación electromagnética emitida o absorbida por los analitos. Todo analito molecular es capaz de absorber ciertas longitudes de onda de la radiación electromagnética. Dicha energía es transferida temporalmente a la molécula y como consecuencia, disminuye la intensidad de radiación [7].

**Espectrofotometría de absorción atómica.** Espectrofotometría de absorción atómica (E.A.A.), es un método analítico que permite identificar los elementos presentes en la materia y su concentración. Este método consiste en la medición de las especies atómicas por su absorción a una longitud de onda particular. La especie atómica se logra por atomización de la muestra, siendo los distintos procedimientos utilizados para llegar al estado fundamental del átomo lo que diferencia las técnicas y accesorios utilizados. La técnica de atomización más utilizada es la de absorción atómica por flama o llama, que nebuliza la muestra y luego la disemina en forma de aerosol dentro de una llama de aire con acetileno u óxido nitroso-acetileno [8].

La Absorción Atómica (AA) en llama es a la

fecha la técnica más ampliamente utilizada para determinar elementos metálicos y metaloides. Estas técnicas tienen grandes ventajas y es de costo relativamente bajo, pudiéndose aplicar tal técnica a una gran variedad de muestras.

**Digestión ácida para la determinación de metales.** Para realizar la determinación de metales por absorción atómica de llama, es necesario tener los analitos en solución, y libres de posibles interferentes, tales como materia orgánica, o particulado. Para lograr estas condiciones, y con el objeto de reducir la interferencia por materia orgánica y liberar los metales de la matriz manteniéndolos en solución, es necesario el tratamiento previo de las muestras, y se debe realizar el procedimiento de preparación, digestión y preservación. Estos tratamientos se realizan según el tipo de matriz [9].

La digestión de las muestras consiste en una mineralización húmeda. Para esto se utilizan ácidos concentrados y calentamiento, es así que en la mayoría de casos la digestión es llevada a cabo con ácido nítrico, ya que es adecuado para la extracción de diversos metales, sin embargo, algunas muestras necesitan de la adición de diferentes ácidos fuertes tales como el ácido perclórico, ácido sulfúrico o ácido clorhídrico para producir una digestión ácida lo suficientemente agresiva para lograr una digestión completa. Para las digestiones se puede utilizar:

**Ácido nítrico.** Es un líquido incoloro que se descompone lentamente por la acción de la luz, adoptando una coloración amarilla por el  $\text{NO}_2$  que se produce en la reacción. El ácido nítrico es uno de los más fuertes desde el punto de vista iónico. Pero lo que lo caracteriza químicamente es su energía de acción oxidante.

**Solución Nítrico-Perclórica.** Está formada por la mezcla de cuatro partes de ácido nítrico y un parte ácido perclórico en volumen [10]. Esta solución por la acción del ácido nítrico es un fuerte oxidante y por el ácido perclórico es adecuado para la destrucción de materia, sin embargo, se debe tener cuidado cuando se

utiliza este reactivo por la tendencia del ácido perclórico a reaccionar de forma explosiva con la materia orgánica.

**Agua Regia.** El agua regia es una solución altamente corrosiva y fumante, de color amarillo, formada por la mezcla de ácido nítrico concentrado y ácido clorhídrico concentrado en la proporción de una a tres partes en volumen [11].

Es uno de los pocos reactivos que son capaces de disolver el oro, el platino y el resto de los metales. Fue llamada de esa forma porque puede disolver aquellos llamados metales regios, reales, o metales nobles. Es utilizada en el aguafuerte y algunos procedimientos analíticos. El agua regia no es muy estable, por lo que debe ser preparada justo antes de ser utilizada.

**Metales pesados como contaminantes tóxicos.** Los metales pesados son considerados peligrosos debido a que no presentan una forma de degradación física, química o biológica, así también a la bioacumulación que pueden presentar durante largos periodos de tiempo. Los metales pesados pueden ser retenidos en el suelo y luego absorbido por plantas mediante adsorción en la superficie de las partículas minerales, formación de complejos con las partículas orgánicas y última instancia por reacciones de precipitación.

**Cadmio.** El cadmio es un elemento que se encuentra en forma natural en la corteza terrestre. El cadmio puro es un metal suave y de color blanco plateado. Por lo general, el cadmio no se encuentra en el ambiente como un metal puro, sino como un mineral combinado con otros elementos como el oxígeno (óxido de cadmio), el cloro (cloruro de cadmio) o el azufre (sulfato o sulfuro de cadmio). El cadmio es más abundante en la naturaleza en la forma de óxidos complejos, sulfuros y carbonatos en el zinc, el plomo y las minas de cobre. En raras ocasiones se encuentra en grandes cantidades como cloruros y sulfatos [12].

**Cacao.** El término cacao representa

exclusivamente a la especie *Theobroma cacao* Lineo perteneciente a la familia *Sterculiaceae* del género *Theobroma*. Una mazorca de cacao tiene una corteza rugosa de casi 4 cm de espesor. Está rellena de una pulpa rosada viscosa, dulce y comestible, que encierra de 30 a 50 granos largos (blancos y carnosos) acomodados en filas en el enrejado que forma esa pulpa. Los granos del cacao tienen la forma de las judías: dos partes y un germen rodeados de una envoltura rica en tanino. Su sabor en bruto es muy amargo y astringente [13].

La mayoría de las plantaciones de cacao se encuentran en las proximidades de la línea ecuatorial y a baja altitud. Requiere temperaturas medias anuales elevadas con fluctuaciones pequeñas y una gran humedad. Generalmente el cacao se cultiva buscando un auto sombraje que sirve como una cubierta que lo protege de la insolación directa y de la evaporación. Su cultivo requiere una temperatura máxima y mínima de 30-32°C y 18-21°C, respectivamente [13].

**Parámetros Estadísticos.** Se describe algunos de los criterios cuantitativos que se pueden utilizar para decidir si un determinado método instrumental es o no adecuado para resolver un problema analítico. Estas características se expresan en términos numéricos y se denominan parámetros de calidad [7].

**Linealidad.** De acuerdo a la AOAC- PVMC se deduce que el intervalo lineal es el intervalo de concentraciones del analito dentro del cual los resultados de prueba obtenidos por el método son proporcionales a la concentración del analito [14].

**Límite de confianza de la curva.** Son límites que incluyen un grado de confianza previamente asignado (nivel de confianza para la pendiente y la ordenada).

**Límite de detección (LD).** Se puede definir como la concentración más baja de analito presente en una muestra que puede ser detectable [15]. El límite de detección (LD) es la cantidad de analito que proporciona una señal y es igual a

tres veces el ruido de la media. Para algunos equipos se puede establecer que el LD es, aproximadamente tres veces la desviación estándar.

**Límite de cuantificación (LQ).** Se puede definir como la concentración más baja del analito presente en una muestra que puede ser determinada con una precisión y exactitud aceptables para las condiciones de trabajo [15].

**Precisión.** Grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos, utilizando una muestra homogénea, bajo condiciones establecidas. Se puede medir por el grado de reproducibilidad o repetibilidad del método analítico, siendo usualmente expresadas por la desviación estándar [16].

Las medidas de precisión más comunes son la “repetibilidad” y la “reproducibilidad”. Éstas representan las dos medidas extremas de precisión que pueden obtenerse.

**Repetibilidad.** Según la ISO 3534-1 es la precisión en condiciones de repetibilidad, es decir, condiciones según las cuales los resultados independientes de una prueba se obtienen con el mismo método, sobre objetos de prueba idénticos, en el mismo laboratorio, por el mismo operador, usando el mismo equipo y dentro de intervalos de tiempo cortos’.

**Reproducibilidad.** Precisión bajo condiciones de reproducibilidad, es decir, condiciones según las cuales los resultados de prueba se obtienen con el mismo método, sobre objetos de prueba idénticos, en diferentes laboratorios, por diferentes operadores, usando diferentes equipos [14].

**Intervalo de trabajo.** Este intervalo normalmente está comprendido entre el límite de cuantificación y el valor asignado al mayor patrón utilizado. Nótese que esto se refiere al intervalo de concentraciones o a los valores de la propiedad relacionada, de las disoluciones medidas realmente más que de las muestras originales [14].

#### METODOLOGÍA

La investigación muestra la comparación de tres formas de extraer el cadmio de almendras de cacao para ser analizado por espectrofotometría de absorción atómica por flama; estas técnicas están basadas en la digestión ácida de la muestra. Antes de ser analizadas las almendras son sometidas a un proceso de secado, descascarillado y molienda para obtener muestras de características homogéneas. En la Tabla 1 se describe el procedimiento de los métodos de extracción evaluados.

**Tabla 1.** Métodos de extracción

Método extracción	Principio	Procedimiento
I	Calcinación y digestión con ácido nítrico al 1 %	En una cápsula de porcelana, pesar 5 gramos de cacao molido, llevar a la mufla a 800°C, obtener cenizas libres de partículas. Adicionar 10 ml de ácido nítrico concentrado, llevar a la plancha de calentamiento hasta reducir el volumen. Filtrar y aforar con ácido nítrico al 1% (AGROCALIDAD, 2012)
II	Digestión con solución nítrica-perclórica	En un matraz, pesar 5 gramos de cacao molido, adicionar 25 ml de la solución nítrica-perclórica, reposar una hora, llevar a la plancha de calentamiento a $\pm 60^\circ\text{C}$ por aproximadamente 4 a 5 horas hasta digestión total. La digestión estará completa cuando desaparezcan los vapores amarillos y haya formación de un líquido incoloro. Filtrar y aforar con agua tipo I. (Mite et al., 2010)
III	Digestión con agua regia	En un matraz pesar 5 gramos de cacao molido, adicionar 10 ml de agua tipo I y 25 ml de agua regia obteniendo una pasta; dejar en reposo por 16 a 18 horas. Colocar en una plancha de calentamiento a $\pm 105^\circ\text{C}$ por aproximadamente 3 horas, después de ese tiempo adicionar 10 ml más de agua regia, continuar la digestión por 2 horas más, agitar esporádicamente hasta que la muestra tenga la apariencia de una pasta de color amarillo. Enfriar, filtrar y aforar con ácido nítrico al 1%. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Metodología adaptada al Laboratorio de acuerdo a lo utilizado por Francisco Mite, Manuel Carrillo y Wuellings Durango en “Avances del Monitoreo de Presencia de Cadmio en Almendras de Cacao, Suelos y Aguas en Ecuador”, 2010

Al finalizar cada uno de las técnicas de extracción se obtuvieron soluciones acuosas de cacao en las cuales se determinó la concentración de cadmio utilizando una curva de calibración de 25–250 ug/L a través de espectrofotometría de absorción atómica por llama.

**RESULTADOS**

**Análisis estadístico de los resultados**

Una vez obtenidos los resultados promedios, se puede observar la variación de la concentración de cadmio (mg/Kg) extraída según la técnica utilizada. En la Figura 1 se muestra que existe una mayor extracción del analito al aplicar la técnica de extracción III.

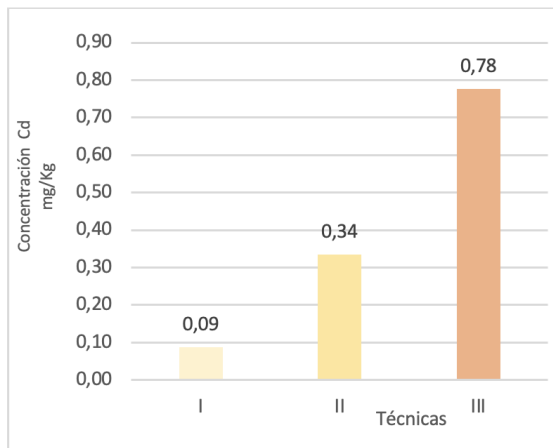


Figura 1. Resultados promedio obtenidos al emplear cada técnica de extracción

Los datos obtenidos fueron comparados estadísticamente a través de un ANOVA. En la

Tabla 2 se muestra que existe una diferencia significativa entre los resultados al aplicar cada una de las técnicas a la muestra de ensayo.

Tabla 2. Resumen de ANOVA

Origen de la Varianza	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Diferencia Cuadrados Medios	F.cal	F.tab	
					5%	1%
Total	0,7315	8				
Tratamientos	0,7297	2	0,3648	1228,94**	5.14	10.92
Error	0,0018	6	2,97x10 <sup>-4</sup>			

Para poder determinar que técnica fue la adecuada para la extracción de cadmio de las almendras de cacao, se tomaron como valor referencia los resultados emitidos por dos laboratorios externos acreditados en el parámetro de cadmio de acuerdo a la Norma ISO/EC 17025. A continuación, en la Tabla 3 se muestran los resultados emitidos por los laboratorios externos (L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>) y los obtenidos durante el ensayo aplicando la técnica III (L<sub>3</sub>).

Tabla 3. Resultados presentados por laboratorios

	Laboratorios		
	L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>	L <sub>3</sub>
R1	0.73	0.75	0.73
R2	0.69	0.77	0.79
R3	0.67	0.73	0.79
Promedio	0.70	0.75	0.77

L<sub>3</sub> datos obtenidos con la técnica III

Los resultados del ANOVA de la Intercomparación mostrados en la Tabla 4, indican que no existe

diferencia significativa entre los resultados obtenidos por los laboratorios, es decir estadísticamente sus resultados son semejantes.

Tabla 4. Resumen ANOVA para Intercomparación

Origen de la Varianza	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Diferencia Cuadrados Medios	F.cal	F.tab	
					5%	1%
Total	0.0117	8				
Tratamientos	0.0066	2	0.0033	3.94ns	5.14	10.92
Error	0.0050	6	0.0008			

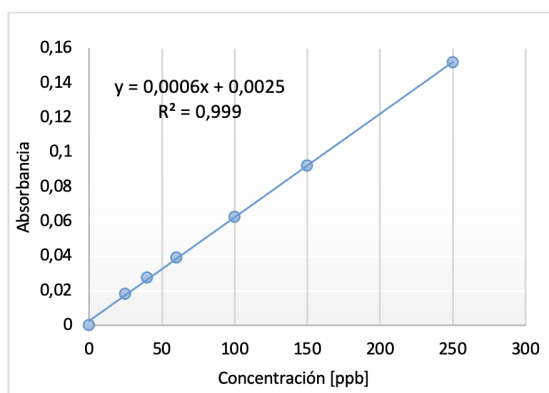
Una vez confirmado estadísticamente que la Técnica III es la apropiada para la extracción de cadmio en almendras de cacao, se procedió a determinar algunos parámetros necesarios para comprobar que los resultados obtenidos por el método son fiables y adecuados para nuestro propósito.

**Parámetros estadísticos para el método**

**Linealidad.** Se utilizó una curva de calibración de 6 niveles. En la Tabla 5 se muestran las concentraciones de cadmio utilizadas para la determinación de la linealidad, y en la Figura 2 se presenta la gráfica obtenida al relacionar la concentración de cada de los puntos de calibración con la absorbancia obtenida.

**Tabla 5.** Concentración de la curva de calibración

Concentración (ppb)	L <sub>1</sub>
0.00	0
25.00	0,0183
40.00	0,0278
60.00	0,0393
100.00	0,0628
150.00	0,0923



**Figura 2.** Curva de calibración. Concentración vs Absorbancia

**Límite de confianza de la curva.** Los límites de confianza superior e inferior de la curva se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Intervalo o región de confianza de la curva de calibración

C (ug/L)	Lsup	Linf
0	0,00458	0,0005
25	0,01998	0,0151
40	0,02923	0,0238
60	0,04155	0,0354
100	0,06619	0,0587
150	0,09700	0,0878
250	0,15862	0,1461

**Límite de detección y límite de cuantificación.** El límite de detección (LOD) es de 7 ug/L, concentración mínima en la muestra que puede ser detectada con el equipo. El límite de cuantificación (LOQ) es de 23.33 ug/L, a partir de este valor se puede cuantificar con veracidad y precisión aceptable.

**Precisión.** Los resultados obtenidos para evaluar la precisión dentro de los grupos (dispersión) para comprobar la repetibilidad de los resultados y entre los grupos (tratamientos) de repetición para comprobar la reproducibilidad se muestran en la Tabla 7.

A partir de los datos obtenidos de la tabla anterior se calcularon las desviaciones estándar de repetibilidad (Sr) y desviación estándar de reproducibilidad (SR) mostrada en la Tabla 8.

**Tabla 7.** ANOVA del método comparándola con el valor estadístico de Fisher (F).

Origen de la Varianza	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Diferencia Cuadrados Medios	F.cal	F.tab	
					5%	1%
<b>Total</b>	0.0066	11				
<b>Tratamientos</b>	0.0025	2	0.0012	2.74ns	4.26	8.02
<b>Error</b>	0.0041	9	4.6 x10 <sup>-4</sup>			
<b>S<sub>r</sub> =</b>	0.0214	<b>SL<sup>2</sup> =</b>	2.01 x10 <sup>-4</sup>	<b>S<sub>R</sub> =</b>	0.0256	

**Tabla 8.** Desviación estándar y coeficiente de variación de la reproducibilidad y repetibilidad

Muestra	Concentración (mg/Kg)	S <sub>r</sub> (mg/Kg)	% S <sub>r</sub>	S <sub>R</sub> (mg/Kg)	%S <sub>R</sub>
	0.753	0.0214	2.84	0,0256	3.39

**Prueba Inter Laboratorio**

En el año 2019 el Instituto Francés de Investigación y Desarrollo IRD, en conjunto de CEFA y el Ministerio de Agricultura realiza una prueba Inter laboratorio como parte

del proyecto “Reactivación del café y cacao Nacional fino de aroma” en el cual participaron diez laboratorios incluido el Laboratorio de Bromatología de la AGROCALIDAD<sup>2</sup>; el mismo que obtuvo resultados satisfactorios en su participación. Ver Tablas 9 y 10.

**Tabla 9.** Resultados de comparación inter-laboratorio de la muestra 1 de cacao en polvo

CODIGO DE LA MUESTRA	Equipo utilizado	Fecha de análisis	LOD (mg/Kg) LOQ (mg/Kg)		Material de Referencia (en caso de tener)		Número de replicas de mineralización	Número de lecturas (n)	Contenido de Cd expresados en mg/kg				z-score	score % USFQ results
			Nombre del MR	Rendimiento (%)	Promedio	Máx			Min	Desviación estándar (σ)				
M1-L1	Espectrofotómetro de Absorción atómica de llama	03/07/2019	0,02mg/kg	0,23mg/kg	NO APLICA	NO APLICA	2	3	0,63	0,634	0,621	0,009	0,180	0,0535
M1-L2	EQ-FQ-65 Horno Grafito Varian GTA 120	05/07/2019	0,2 ug/kg	0,3ug/kg	FQ-MR-117 PT BIPEA Abril 2019	94%	3	3	0,269	0,272	0,264	0,004	1,819	-4,3421
M1-L3	ABSORCIÓN ATÓMICA PERKIN ELMER AA400	02-11 Julio	0,20 mg/Kg	0,50 mg/Kg	NO APLICA	NO APLICA	7	7	0,610	0,670	0,570	0,030	0,069	-0,1900
M1-L4	Perkin Elmer Aanalys 400/ Perkin Elmer HGA 900	03 y 04 de julio 2019	5 ug/kg	25 ug/kg	NO APLICA	NO APLICA	6	12	0,521	0,598	0,450	0,046	0,425	-1,2761
M1-L5	EAA acoplado a HGA	04/07/2019	0,36 ug/L	1,2 ug/L	Tomato leaves	105,47	4	8	0,86	0,95	0,80	0,075	1,468	2,8845
M1-L6	ICP OES THERMO SCIENTIFIC I CAP 7000	10/07/2019	0,0047	0,0158	NIST 2384 Baking Chocolate	100%	2	3	0,626	0,652	0,602	0,082	0,156	0,0000
M1-L7	Espectrometro de absorción atómica, marca PerkinElmer, modelo Pinnacle 900T	28/06/2019	0,0014	0,0046	NA	NA	3	9	0,430	0,438	0,405	0,019	0,928	-2,3817
M1-L8	PerkinElmer PINAAACLE900T	11/07/2019	>0,001	>0,001	Baking Chocolate 2384	96,4%	2	6	0,858	0,909	0,809	0,039	1,443	2,8297
M1-L9	SUIMADZU AA-6300	02-jul-19	0,05 mg/L	0,1 mg/L	NA	NA	2	4	0,51	0,52	0,5	0,01	0,485	-1,4076
M1-L10	Absorción Atómica Perkin Elmer Pinnacle 900T	04/07/2019		0,02	FAPAS T07143	106,35%	2	2	0,659				0,341	0,4067

Fuente: [17].

**Tabla 10.** Resultados de comparación inter-laboratorio de la muestra 2 de cacao en polvo

CODIGO DE LA MUESTRA	Equipo utilizado	Fecha de análisis	LOD (mg/Kg) LOQ (mg/Kg)		Material de Referencia (en caso de tener)		Número de replicas de mineralización	Número de lecturas (n)	Contenido de Cd expresados en mg/kg				z-score	score % USFQ results
			Nombre del MR	Rendimiento (%)	Promedio	Máx			Min	Desviación estándar (σ)				
M2-L1	Espectrofotómetro de Absorción atómica de llama	03/07/2019	0,02mg/kg	0,23mg/kg	NO APLICA	NO APLICA	2	3	1,39	1,3886	1,3860	0,0018	0,333	0,8226
M2-L2	EQ-FQ-65 Horno Grafito Varian GTA 120	05/07/2019	0,2 ug/kg	0,3ug/kg	FQ-MR-117 PT BIPEA Abril 2019	94%	3	3	1,382	1,424	1,33	0,048	0,345	0,7611
M2-L3	ABSORCIÓN ATÓMICA PERKIN ELMER AA401	02-11 Julio	0,20 mg/Kg	0,50 mg/Kg	NO APLICA	NO APLICA	7	7	1,51	1,55	1,44	0,04	0,154	1,7456
M2-L4	Perkin Elmer Aanalys 400/ Perkin Elmer HGA 900	03 y 04 de julio 2019	5 ug/kg	25 ug/kg	NO APLICA	NO APLICA	6	12	1,453	1,664	1,204	0,111	0,239	1,3071
M2-L5	EAA acoplado a HGA	04/07/2019	0,36 ug/L	1,2 ug/L	Tomato leaves	105,47	4	8	2,10	2,25	1,70	0,295	0,722	6,2840
M2-L6	ICP OES THERMO SCIENTIFIC I CAP 7000	10/07/2019	0,005	0,016	NIST 2384 Baking Chocolate	100%	2	3	1,283	1,337	1,234	0,130	0,491	0,0000
M2-L7	Espectrometro de absorción atómica, marca PerkinElmer, modelo Pinnacle 900T	28/06/2019	0,0014	0,0046	NA	NA	3	9	0,948	1,004	0,885	0,047	0,989	-2,5773
M2-L8	PerkinElmer PINAAACLE900T	12/07/2019	>0,001	>0,001	Baking Chocolate 2384	96,4%	2	6	3,341	3,703	2,007	0,658	2,566	15,8299
M2-L9	SUIMADZU AA-6300	02-jul-19	0,05 mg/L	0,1 mg/L	NA	NA	2	4	1,22	1,23	1,21	0,01	0,585	-0,4851
M2-L10	Absorción Atómica Perkin Elmer Pinnacle 900T	04/07/2019		0,02	MPAS T0714	106,35%	2	2	1,512				0,151	1,7610

Fuente: [17].

<sup>2</sup> L1 – Laboratorio Bromatología de AGROCALIDAD



## CONCLUSIONES

La determinación de cadmio en granos de cacao es muy importante para la economía del país ya que Ecuador es exportador de cacao fino de aroma, por lo tanto, se deben cumplir las especificaciones de normativas reglamentarias con lo cual se brindará la confianza necesaria para la apertura de mercados internacionales.

Al estudiar el efecto que tienen cada una de las técnicas de extracción sobre las almendras de cacao, se estableció que la técnica de extracción III, la cual utiliza agua regia, es la apropiada para determinar cadmio utilizando espectrofotometría de absorción atómica por llama.

La intercomparación para el análisis de cadmio con el método seleccionado en el laboratorio de prueba y los dos laboratorios acreditados, arrojó los siguientes resultados:  $L_1$  con un promedio de 0.70 mg/Kg,  $L_2$  0.75 mg/Kg y el laboratorio de prueba  $L_3$  0.77 mg/Kg, de cuyo análisis de varianza se obtuvo una  $F_{cal}$  menor que la  $F_{tab}$ , permitiendo concluir que estadísticamente sus resultados no difieren significativamente.

La estandarización del método conseguirá dar seguridad a los exportadores ecuatorianos de que los resultados son fiables y no se produzcan rechazos al llegar el cacao a su destino.

El ensayo inter-laboratorio realizado en el año 2019 arroja resultados satisfactorios, demostrando que el método genera resultados fiables para el uso previsto.

## REFERENCIAS

1. Cobos C. Propuesta de un plan de exportación de chocolate con macadamia al mercado alemán. Quito: Universidad Internacional del Ecuador. 2019
2. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Ecuador es el primer exportador de cacao en grano de América. Disponible en: <https://www.agricultura.gob.ec/ecuador-es-el-primero-exportador-de-cacao-en-grano-de-america/>
3. León-Villamar, F., Calderón-Salazar, J., Mayorga-Quinteros, E. Estrategias para el cultivo, comercialización y exportación del cacao fino de aroma en Ecuador. Revista Ciencia UNEMI. 2016; 9(18): 45-55
4. INEN. (2019). Material de referencia de Cadmio en Cacao en proceso de Certificación por el INEN.
5. Mite, F., Carrillo, M., & Durando, W. (2010). Avances del monitoreo de presencia de cadmio en almendras de cacao, suelos y aguas de Ecuador. XII Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del suelo.
6. Nr, S., Nierensch, M., Bundesinstitut, D., Bestandteile, W., Schokolade, B., Tolerable, P., Intake, W., Bfr, D., li, V., Generaldirektion, B. D., & Sanco, D. G. BfR schlägt die Einführung eines Höchstgehalts für Cadmium in Schokolade vor. 2007; (015): 1–18).
7. D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman. Principios de Análisis Instrumental. 5ª edición. Editorial McGraw Hill Interamericana, 2000.
8. Harris, D. (2007). Analisis quimico cuantitativo/ Quantative Chemistry Analysis (Spanish Edition).
9. Beccaglia AM. Instructivo de preparación, digestión y preservación de muestras (aguas, efluentes, alimento y suelos) para análisis de metales por absorción atómica. VI Congreso Virtual Iberoamericano Gestión de Calidad en Laboratorios. 2010
10. Brown C. Organic Reaction Mechanisms. Estados Unidos: John Wiley & Sons Ltd.1977
11. Hinkamp D. (2014). WebAcademia.
12. ATSRD. Resumen de Salud Pública Cadmio. In Medicina. 1999. Disponible en: [www.atsdr.cdc.gov/es](http://www.atsdr.cdc.gov/es)
13. Braudeau, J. Cacao. Técnicas Agrícolas y Producciones. Barcelona-España. 1970. p. 299.
14. Magnusson B. y Örnemark U. (eds.). Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. 2014).
15. Morante Zarcero, S. (2007). Desarrollo de métodos analíticos para la separación

- quiral y su aplicación al estudio de procesos de síntesis asimétrica. Madrid, España: Dykinson. 2007
16. Lemos, C. (2011). CR GA09 Criterios Generales R00 Acreditación de Laboratorios Clínicos. Organismo de Acreditación Ecuatoriano OAE. 2011
17. Laurence M. (2019). Informe de Actividades y Resultados. Taller teórico-práctico para optimizar procedimientos analíticos de cadmio en muestras de cacao. Ministerio de Agricultura y Ganadería – MAG.