



Producto 4. Metodología estandarizada para la determinación de cadmio (Cd) en suelos y material de cacao (*Theobroma cacao*. L.)

Mariela Martínez A., Daniel Bravo, Yeni Rodríguez-Giraldo, Laura Ramírez, Elías García, Martha Hidalgo y Eduardo Chávez

2023



Plataforma Multiagencia
Cacao 2030-2050



FONTAGRO



Códigos JEL: Q16

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

El presente documento ha sido preparado por Mariela Martínez Arroyo, Daniel Bravo, Yeni Rodríguez Giraldo, Laura Ramírez Cartín, Elías García, Martha Hidalgo y Eduardo Chávez Navarrete.

Copyright © 2022 Banco Interamericano de Desarrollo. Esta obra se encuentra sujeta a una licencia Creative Commons IGO 3.0 Reconocimiento-NoComercial-SinObrasDerivadas (CC-IGO 3.0 BY-NC-ND) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/igo/legalcode>) y puede ser reproducida para cualquier uso no comercial otorgando el reconocimiento respectivo al BID. No se permiten obras derivadas. Cualquier disputa relacionada con el uso de las obras del BID que no pueda resolverse amistosamente se someterá a arbitraje de conformidad con las reglas de la CNUDMI (UNCITRAL). El uso del nombre del BID para cualquier fin distinto al reconocimiento respectivo y el uso del logotipo del BID no están autorizados por esta licencia CC-IGO y requieren de un acuerdo de licencia adicional. Note que el enlace URL incluye términos y condiciones adicionales de esta licencia.

Esta publicación puede solicitarse a:

FONTAGRO

Correo electrónico:

fontagro@fontagro.org

www.fontagro.org



Tabla de contenido

Índice de figuras	4
Índice de tablas	4
Abstract.....	5
Resumen ejecutivo.....	6
Glosario de términos.....	8
Introducción.....	10
Sección 1 - Condiciones y procedimientos iniciales.....	13
Sección 2 - Condiciones Analíticas.....	19
Sección 3 - Metodología analítica.....	23
Sección 4 - Control analítico y de calidad (QA/QC).....	29
Sección 5 - Interpretación de los resultados.....	33
Referencias Bibliográficas	36
Anexo 1. Diagrama de flujo del procedimiento inicial	39
Anexo 2. Diagrama de flujo de la metodología analítica	40
Instituciones Participantes.....	41
.....	41

Índice de figuras

Figura 1. Ejemplo gráfico de colecta de muestras de suelo	14
Figura 2. Ejemplo general de selección de zona de trazado y muestreos de diferente material vegetal para análisis de cadmio	15
Figura 3. Ejemplo gráfico de colecta de muestras de hojas y almendras de cacao.....	15
Figura 4. Preparación de muestras de suelo: secado, molido y tamizado	17
Figura 5. Preparación de muestras de hojas: secado, triturado y tamizado	17
Figura 6. Preparación de muestras de almendras de cacao: lavado, secado y tamizado	18
Figura 7. Elaboración de muestras compuestas y cuarteo. Fuente Rodríguez et al., 2022	19
Figura 8. Equipos analíticos (ICP-OES, ICP-MS) utilizados para la determinación de Cd y otros elementos.....	21
Figura 9. Destilador de ácidos.....	22
Figura 10. Pesaje de muestras en tubos de borosilicato para digestión abierta (izquierda) y teflón para digestión por horno microondas (derecha)	24
Figura 11. Equipos usados para mineralizar muestras de suelo y tejido. Plancha calentadora y hornos microondas.....	26
Figura 12. Filtrado y dilución de muestras para medición de cadmio (Cd) y otros elementos	26
Figura 13. Curva de calibración de Cd.....	27

Índice de tablas

Tabla 1. Valores mínimos, máximos, mediana y cuartiles (Q1: 25 % y Q3: 75 %) de las concentraciones de cadmio (Cd) en muestras de suelos, hojas y almendras de cacao (Argüello et al., 2019)	27
Tabla 2. Materiales de Referencia Certificados (MRCs) que pueden ser utilizados como parte del QA/QC en suelos, hojas y almendras de cacao.	32



Abstract

Cadmium (Cd) is an environmental contaminant that can affect consumer health. Although it is typically found in trace amounts in the soil, its accumulation in plants, such as cocoa, can pose a health risk due to its cumulative and non-biodegradable nature. Cocoa has a high capacity to absorb cadmium from the soil, leading to regulations by the European Union to limit cadmium levels in cocoa products, such as chocolate. These regulations, which were discussed in international committees over 10 years ago, were implemented as of January 1, 2019. This has placed pressure on cocoa-producing countries, affecting their exports to the EU and increasing the costs of cadmium analysis in laboratories. Cadmium is present in low levels in cocoa beans, traditionally analyzed in laboratories that typically focus on nutrients with higher levels. The low cadmium concentration presents challenges in accurately determining it in soil and plant tissue, including cocoa beans. To address these challenges, the importance of metrological quality in cadmium analysis is emphasized. This would allow access to regulated markets, determine the suitability of new cocoa-growing areas, and promote the growth of the cocoa industry in countries such as Ecuador, Colombia, and Peru. The technical note provides information on the implementation of suitable analytical processes for determining cadmium concentrations in soil, leaves, and cocoa beans. It is structured into five sections, covering everything from field sample collection to result interpretation and report delivery to stakeholders. The importance of establishing analytical quality assurance and quality control (QA/QC) protocols to ensure result traceability and repeatability is highlighted. The implementation of these criteria will improve the quantification of cadmium in laboratories in the region, benefiting the cocoa value chain in countries that adopt these recommendations.

Keywords: Analytical methodology, cadmium in cocoa, certified reference materials, laboratories, quality assurance (QA/QC), safety.

Resumen ejecutivo

El cadmio (Cd) es un contaminante ambiental que afecta la salud de los consumidores. En el suelo, puede acumularse en cantidades trazas ($< 1 \text{ mg Cd kg}^{-1}$ de suelo, dependiendo del enriquecimiento natural o antropogénico) mientras en plantas esta concentración puede verse magnificada poniendo en riesgo la salud de los consumidores debido a su propiedad acumulativa y no biodegradable.

La planta de cacao (*Theobroma cacao*, L.) es un arbusto de origen amazónico que tiene una alta capacidad de absorción del contaminante, expresada como factor de transferencia > 1 (TF = ratio o tasa de Cd en planta sobre suelo). Debido a esto, antes de control, como la European Food Safety Authority (EFSA), recomendaron regular el contenido de Cd en productos derivados de cacao, como chocolate. En adición, la UE estableció límites máximos de Cd en productos de chocolate listos para el consumidor de entre 0,10 y 0,80 mg kg^{-1} . Todo esto, si bien se discutió hace más de 10 años en comités internacionales, se implementó a partir del 1 de enero de 2019.


Esta normativa, además de regulaciones y/o recomendaciones que se discuten actualmente a nivel regional o local, ha puesto presión en los países productores de cacao que han visto afectadas sus exportaciones a la UE o incrementado sus costos por los análisis de Cd en laboratorio.

Cadmio es un metal pesado que se encuentra presente (en promedio) a niveles $< 1 \text{ mg kg}^{-1}$ en almendras de cacao, producto base para la elaboración de chocolate. Tradicionalmente, los laboratorios han determinado analíticamente la concentración de elementos nutritivos, cuyos niveles superiores pueden llegar hasta los 10 mg kg^{-1} . La concentración de Cd pone a prueba la fiabilidad de los laboratorios de la región para determinar este elemento en suelos y tejido vegetal, incluyendo granos de cacao, debido a los valores bajos en mg kg^{-1} o partes por millón (ppm).

Un servicio de análisis de Cd debe priorizar la calidad metrológica. Esto permitirá, entre otras cosas, promover aspectos importantes como:

- 1) El acceso a los mercados regulados a través de análisis de Cd en lotes comerciales de cacao antes de su exportación y/o análisis de la concentración de Cd en zonas ya cultivadas con cacao.
- 2) Determinar la idoneidad de nuevas áreas de cacao mediante el análisis de la concentración de Cd en suelos, y en otras propiedades del cultivo, para una potencial expansión del área cacaotera, con una menor probabilidad de elevados niveles de Cd en almendras. Esto último es de vital importancia para países donde el área de cultivo está en claro crecimiento, como Ecuador, Colombia y Perú.

Dados estos aspectos importantes que dependen de una precisa y exacta determinación de Cd, esta nota técnica tiene como objetivo proveer la información necesaria para implementar procesos analíticos adecuados que permitan la determinación de las



concentraciones de Cd en suelos, hojas y almendras¹ de cacao. La nota técnica está estructurada en cinco secciones:

- (i) Condiciones y procedimientos iniciales,
- (ii) Condiciones generales,
- (iii) Procedimiento analítico,
- (iv) Aseguramiento de calidad analítica (QA/QC),
- (v) Interpretación de resultados.

El documento abarca desde la correcta toma y etiquetado de las muestras, en campo, hasta la interpretación de los resultados de los laboratorios y entrega de reportes a los clientes: productores primarios, asistentes técnicos o inversionistas y exportadores. Además, detalla el equipamiento básico necesario, así como las ventajas y desventajas del uso de procesos como digestión abierta o asistida por microondas para el análisis de Cd. El documento hace especial énfasis en la necesidad de establecer protocolos de aseguramiento de calidad analítica (QA/QC) que permitan la trazabilidad y repetibilidad de los resultados, proceso tan importante que amerita una sección independiente. Es así como la implementación de los criterios de esta nota técnica mejorará la cuantificación de Cd en suelos, hojas y almendras de cacao en los laboratorios de la región, beneficiando así al crecimiento de la cadena de valor de cacao en los países productores que adopten estas recomendaciones generadas a través del proyecto Plataforma Cacao 2030-2050.

Palabras Clave: metodología analítica, cadmio en cacao, materiales de referencia certificados, laboratorios, aseguramiento de calidad (QA/QC), inocuidad.

¹ El procedimiento de almendras es replicable para chocolate y/o otros derivados de cacao, como el licor.



Glosario de términos

Bio-disponibilidad: se refiere a las formas de cadmio que pueden migrar o ser transportadas desde el suelo hacia la planta. Esta fracción del cadmio es muy importante, porque es, finalmente, la fracción que interesa medir en granos de cacao para la implementación de la regulación europea en chocolates, o en productos derivados de cacao.

Cadmio: es un elemento químico de número atómico 48 situado en el grupo 12 de la tabla periódica de los elementos. Su símbolo es Cd y se denomina metal pesado por ser 4 veces más denso que el agua. También ha sido clasificado como tóxico y carcinógeno para humanos y otros animales. La forma dominante en suelo es Cd²⁺.

Grano o Almendra de cacao: es la semilla de *Theobroma cacao*, del cual se extraen los sólidos de cacao y la manteca de cacao. Los granos son la base del chocolate. En Colombia se le denomina grano, pero en otros países como Ecuador se le denomina preferencialmente como almendra. En síntesis, son sinónimos del mismo concepto.

Hojarasca: Es la hoja de cacao senescente o que ha caído del individuo de cacao y que se encuentra en proceso de descomposición o saprofitismo. Es muy importante como un indicador de bioacumulación de cadmio por parte del árbol de cacao, por lo cual, debe ser considerado y analizado de forma independiente a la hoja, particularmente por su diferencia con contenido de agua y la fracción a la que el cadmio se encuentre, para con respecto a las hojas frescas o maduras de cacao.


Espectrometría: es el estudio de la interacción entre la radiación electromagnética y la materia, con absorción o emisión de energía.

Finca: en Colombia y Ecuador, corresponden al predio o espacio físico donde se desempeña el productor (en inglés farm o orchard) de cacao para cultivar, sembrar y cosechar, en algunos casos, también se realizan procesos de postcosecha y beneficiados. En Perú, por ejemplo, se usa un término distinto, denominándose así 'chacra' o parcela.

Fitodisponibilidad: Fracción química de los elementos de suelo para formar parte de la fase acuosa y ser absorbidos por las raíces de las plantas.

ICP-OES: la espectroscopía de emisión atómica (conocida por sus siglas AES, a partir del inglés, Atomic Emission Spectroscopy) es un método de análisis químico que utiliza la intensidad de la luz emitida por una llama, un plasma, un arco o chispa eléctricos en una longitud de onda particular para determinar la cantidad de un elemento en una muestra.

ICP-MS: espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente) es una técnica de análisis inorgánico elemental e isotópico capaz de determinar y cuantificar la mayoría de los elementos de la tabla periódica en un rango dinámico lineal de 6 órdenes de magnitud (ng/L – mg/L) además de poder llevar a cabo la determinación de los elementos en un análisis multielemental que provee la composición de la muestra analizada.



Inocuidad alimentaria: se refiere a todos los esfuerzos que se realicen en las cadenas productivas para evitar enfermedades asociadas a la ingesta de alimentos.

Material vegetal: se refiere a todos los tejidos y otras partes que puedan ser colectados dentro del sistema de cacao. Como, por ejemplo, las partes de la planta en su fase activa, o los tejidos muertos en su fase inactiva, como la hojarasca de suelo, o la cacota en pudrición o saprofitismo.

Nibs: es la semilla de cacao fermentado, naturales o tostados, enteros o en trozos, sin piel. Se destacan porque están descascarillados y la testa o pelusa se separa del interior del grano.

Pseudototal: corresponde al total recuperable de una muestra analítica, independientemente su origen, si es suelo o es material vegetal. Incluye las diferentes fracciones que pueda haber disponible en la muestra estudio.

Testa o cascarilla: la semilla del cacao consiste en testa y cotiledón. La testa es la capa externa que luego del proceso de tueste se remueve para la elaboración de chocolate. La testa es un material de “descarte” aunque actualmente se promueve el consumo en infusiones y otros usos.

Introducción


Cadmio (Cd) es un metal pesado que se encuentra en la naturaleza en diferentes concentraciones. Sin embargo, se ha clasificado como un elemento no esencial para el metabolismo de la gran mayoría de organismos vivos (Kabata-Pendias, 2010); excepto para algunos microorganismos que lo pueden usar como fuente de energía (Bravo & Braissant, 2022). En el contexto agrícola, el elemento se encuentra en el suelo por procesos naturales o antropogénicos (Six & Smolders, 2014). Por otra parte, el Cd es un elemento persistente en el suelo ya que no sufre procesos de volatilización y muestra una limitada percolación provocando que las plantas lo absorban y acumulen; por lo tanto, se ha determinado, que la principal vía de contaminación en los seres humanos y animales es el consumo de alimentos contaminados con Cd (Kabata-Pendias, 2010). El consumo prolongado de alimentos con altos niveles de metales, como el cadmio, son perjudiciales para la salud (El Rasafi *et al.*, 2022).

La Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés) ha identificado el consumo de chocolate como una fuente de Cd en la ingesta de alimentos y ha establecido límites máximos permitidos en productos a base de cacao, los cuales varían de 0,10 mg kg⁻¹ y 0,80 mg kg⁻¹ de cadmio en materia seca de cacao (Oliveira *et al.*, 2022). Por lo tanto, determinar de forma precisa la concentración de este metal en los productos derivados de cacao es crítico para asegurar el acceso de la materia prima de cacao de América Latina y El Caribe (LAC) a mercados regulados, como el europeo.

Es importante tener en cuenta que hay diferentes matrices o también denominadas 'tipos de muestras' en las cuales se puede realizar la determinación de Cd sobre el material de interés. Particularmente en el cultivo de cacao, se han destacado el análisis de Cd en muestras de suelos o granos de cacao. Sin embargo, esto no descarta el hecho, de que, particularmente en investigación científica se aborden otro tipo de matrices o 'tipos de muestras' que hacen parte del sistema de cultivo de cacao. Entre ellas, también se puede incluir la determinación de Cd en: a) fertilizantes- pesticidas agroquímicos, b) hojarasca, c) agua para riego, d) enmiendas, orgánicas/biológicas o inorgánicas, u otros elementos compostantes, e) en grano fresco de cacao o semilla, f) en testa o cascarilla, g) en nibs de cacao, h) en cacota o cáscara fresca de la fruta de cacao; i) en elementos o herramientas de labranza.

En cuanto a la determinación de Cd en suelo, algunos países utilizan metodologías para obtener los niveles totales del elemento (biodisponible + no disponible) o pseudo-totales o la cuantificación de Cd sin tener en cuenta el Cd unido a los silicatos), mientras que otros países han optado por utilizar metodologías de extracción simple para identificar la fracción de Cd fitodisponible. Pocos laboratorios utilizan ambas metodologías para identificar total y fitodisponible (Chavez *et al.*, 2016).

De igual forma, existe una amplia variación en las metodologías para la determinación de Cd, por ejemplo: En estudios presentes, en el grupo de Thomas *et al.* (2023), utilizaron una digestión utilizando una mezcla de HCl:HNO₃ en proporción 1:3. En el



grupo coordinado por Rodríguez *et al.* (2022), utilizaron una mezcla (2:1) de HNO₃ y H₂O₂. Por tanto, los enfoques agresivos de digestión se deben a que el elemento se encuentra predominantemente como Cd²⁺ en fracciones de suelo orgánicas y/o minerales. Esto le permite al elemento formar complejos organometálicos con los ligandos del suelo, lo que hace que para una mineralización completa se requiera el uso de procedimientos más destructivos que disuelvan dichas estructuras (Yao *et al.*, 2022).


La medición de este metal en suelos es sin duda, un reto para los laboratorios de debido a los diferentes procedimientos que se usan para medir el Cd fitodisponible. Por ejemplo, en el estudio precede de Ramtahal *et al.* (2015) usaron extracciones simples para modelar la concentración en suelos y su relación con el Cd en almendras. En ese caso, ellos determinaron que DTPA era el método más adecuado. Al contrario, en el estudio de Chávez *et al.* (2016) determinaron que, con el procedimiento conocido como Mehlich 3 y con el extractante HCl a una concentración de 0.1 M, se podía obtener una mejor correlación ($r > 0.80$) con la concentración de Cd en almendras.

Estos resultados demuestran que el uso de un método universal para determinar la concentración de Cd fitodisponible hasta la fecha de publicación de este documento no ha sido reportado, y tal vez no sea posible tener uno, ya que probablemente el Cd fitodisponible varíe entre tipos de suelo y/o en el tipo de matriz a analizar. En adición, la diversidad de métodos que existen en la literatura hace que la selección de la metodología a aplicar sea basada en las condiciones analíticas y/o experiencias de los técnicos de laboratorio, a nivel local, o de laboratorios disponibles, más que en evidencia científica.

Contrario a lo que ocurren en los suelos, el análisis de Cd en material vegetal (hojas, almendras/granos, tallo, entre otros) es mucho más homogéneo. Por ejemplo, Yanus *et al.* (2014) utilizaron la técnica de espectrometría de masas (ICP-MS) para determinar Cd y otros metales, concluyendo que es una técnica apropiada. Recientemente, el equipo liderado por Rodríguez *et al.* (2022) validó una metodología para determinación de Cd en almendras/grano de cacao; los autores reportaron que no existió diferencia entre la detección usando ICP-OES o ICP-MS (Rodríguez *et al.*, 2022). Este hallazgo es positivo para los laboratorios de la región ya que la mayoría de ellos no cuentan con ICP-MS, sino que cuentan solo con ICP-OES o similares. Las ICP-MS son técnicas muy sensibles y apropiadas para la medición de Cd, pero poco disponibles en la región.

Esta nota técnica tiene como objetivo proveer información detallada y estructurada para la determinación de Cd en distintas matrices (suelos y material vegetal) de forma precisa, trazable y repetible. La nota técnica aborda desde el muestreo, pretratamiento y mineralización de las muestras, implementación de estándares de control de calidad y analítica, hasta la interpretación de los resultados. La guía hace especial énfasis en el uso de material de referencia interno, certificado y la forma de reportar e interpretar estos criterios.

Además, cuenta con la experiencia de tres laboratorios con diferentes capacidades y experiencias en la determinación del analito en el cultivo de cacao en LAC, lo que ayuda



a laboratorios de la región a perfeccionar su capacidad metrológica, sin importar sus condiciones y experiencias previas, para poder ajustarse con calidad metrológica en las expectativas de mediciones del metal pesado para cacao y su comercialización.



Sección 1 - Condiciones y procedimientos iniciales

En esta sección se muestran las condiciones y procedimientos iniciales que se deben llevar para asegurar la representatividad y calidad de los resultados, esto van desde el muestreo hasta el almacenamiento de cada muestra (Anexo 1).

I. Muestreo y etiquetado

Una de las consideraciones iniciales y preguntas más frecuentes al momento de recibir muestras desde el campo es la cantidad de muestras a enviar al laboratorio. Este es un factor poco relevante desde la parte analítica ya que la cantidad de muestra usada para el análisis es pequeña (usualmente < 2 g, ver siguiente sección). La pregunta correcta debería ser ¿cuántas muestras debo coleccionar para asegurar representatividad de un predio? En otras palabras, más allá de asegurar un peso mínimo de muestra entregada al laboratorio, el responsable de la toma de muestras debe asegurar que estas representan adecuadamente al área (o lote) donde se extrapolarán los resultados.

En recientes publicaciones, diferentes autores reportan que la variabilidad espacial de Cd en fincas menores a 2 hectáreas es, en promedio, 39% (medido como coeficiente de variación) pero puede llegar hasta 125% en fincas con mayor superficie (Vanderschueren *et al.*, 2021), o incluso en espacios relativamente cercanos, pero con una variabilidad geológica y topográfica importante (Bravo *et al.*, 2021). Las muestras de las diferentes matrices deben tomarse de acuerdo con un 'plan de muestreo' que asegure representatividad de las muestras coleccionadas y que minimice las posibles variaciones espaciales, en unidades geológicas, o de paisaje (Gil *et al.*, 2021) de las fincas o lotes comerciales de cacao.

Para un muestreo representativo se requerirá tomar varias submuestras y homogenizarlas en un recipiente plástico. Una vez homogenizadas, se debe retirar una muestra compuesta, a partir de todas las submuestras mezcladas. El número de submuestras puede variar de acuerdo con las condiciones de cada sitio como la topografía, unidad geológica/cartográfica, paisaje (Bravo *et al.*, 2023), variedades de cacao, estado fenológico del cultivo, edad del cultivo (Gil *et al.*, 2021) manejo de prácticas agronómicas, entre otras. Como regla general, para una finca de entre 2 a 5 hectáreas, se recomienda tomar una muestra compuesta de 8 a 10 submuestras de suelos, de 4 a 5 mazorcas de cacao, y entre 15 y 20 hojas. Para una finca con mayor número de hectáreas se recomienda

realizar muestreos por lotes, de nuevo teniendo en cuenta criterios clave del sistema productivo de cacao, descritos anteriormente.

Con lo que respecta a la toma de muestra de suelos (Figura 1), se sugiere que, en promedio, las muestras de suelo deben ser colectadas en la capa de suelo superficial, en los primeros 15 o máximo 30 cm (Wood & Lass, 1985), a una distancia de ~0.70 m del tronco principal. Se deberán de tomar entre tres y cinco submuestras de 100 g por árbol. Las submuestras se homogenizan en un balde de plástico y se colocan entre 300 y 500 g en una funda Ziplock® o similar para el análisis de laboratorio.

Con respecto a las matrices de hojas y mazorcas, las muestras se deberán tomar de los mismos árboles de donde se colectó la muestra compuesta de suelo. Para hojas, se deben seleccionar ramas sanas y maduras, evitando los chupones, y colectar al menos 15 hojas de edad media, entre la 5^{ta} y 6^{ta} posición contando a partir del ápice. Las hojas se colocarán en fundas de papel con la etiqueta respectiva. Se seleccionará entre dos a tres mazorcas de cacao sanas y maduras por cada árbol (Figura 2). De ser posible, las mazorcas se limpiarán con alcohol para desinfectarlas y se etiquetarán con cinta de papel o algún material adherido a la corteza de la mazorca. Este muestreo se conoce como “muestras pareadas” ya que se colectan muestras de suelo/material vegetal de una misma planta. Si fuera el caso de realizar solo análisis de alguna de las matrices descritas aquí, se recomienda seguir los pasos detallados para el tipo de muestra que se quiera analizar (Figura 3).



Figura 1. Ejemplo gráfico de colecta de muestras de suelo



Figura 2. Ejemplo general de selección de zona de trazado y muestreos de diferente material vegetal para análisis de cadmio

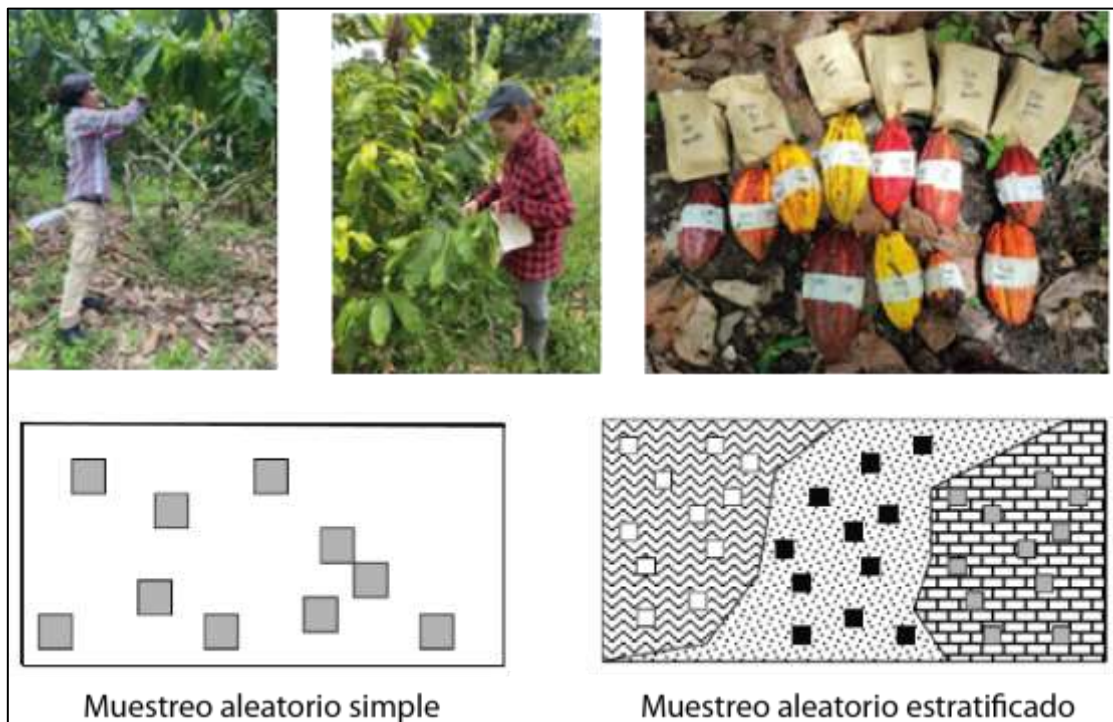


Figura 3. Ejemplo gráfico de colecta de muestras de hojas y almendras de cacao

II. Almacenamiento y transporte

Las muestras de suelo se colocan en bolsas plásticas herméticas, las hojas y mazorcas en bolsas de papel cerradas con cinta y su respectiva identificación (nombre de la muestra, lugar, fecha, persona responsable), este paso se puede llevar a cabo con marcador permanente, etiqueta adhesiva, adicional una segunda marca con papel escrito a lápiz, o utilizando doble bolsa y colocando la identificación entre bolsa y bolsa, siempre evitando que la humedad pueda deteriorar la información (Figura 3). El objetivo es que las bolsas no se rompan y evitar una contaminación cruzada.

Si las muestras deben de ser almacenadas por mucho tiempo, o el transporte hasta el laboratorio toma varios días, se recomienda transportar las muestras en un recipiente térmico con pilas de hielo, para mantener una temperatura aproximada de 4 °C. Esto es muy importante sobre todo para las muestras de material vegetal (mazorcas y hojas) para prolongar la viabilidad de las muestras y evitar el desarrollo de biomasa microbiana. El suelo puede ser custodiado y transportado a temperatura ambiente ya que la concentración de Cd total no varía por efecto de la temperatura.

III. Pretratamiento en laboratorio

a. Suelo

Los resultados de Cd en suelo podrán ser expresados en peso seco, mg Cd kg⁻¹ de suelo, posterior a la corrección por humedad determinada a 105 °C.

Las muestras de suelo se deben secar en una estufa a una temperatura < a 40 °C durante 72 h o al ambiente, una alternativa es extendiendo la muestra sobre papel Kraft debidamente identificada en estantes o en un invernadero para proteger las muestras del viento o lluvia. Posterior a ese tiempo, los suelos secos se muelen con ayuda de molinos de martillos o utilizando un mortero y pistilo, posteriormente se tamizan utilizando una malla de acero inoxidable (< 2 mm) para su homogenización, se recomienda un tamaño de partícula de 0,5 mm para determinación de Cd (Figura 4).



Figura 4. Preparación de muestras de suelo: secado, molido y tamizado.

b. Material vegetal (raíz, tallo, hojas, mazorca)

Los resultados de las matrices podrán ser reportados en peso seco, mg Cd kg^{-1} de material vegetal.

En caso de ser necesario cada matriz deberá ser lavada con agua de grifo y luego agua destilada con el fin de eliminar cualquier partícula de suelo o material extraño adherido en la superficie y remover fertilizantes foliares. Las muestras lavadas deben de ser secadas con papel absorbente y luego ser colocadas en bolsas de papel para secarlas a $70 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 h en la estufa o hasta evidenciar que el material se encuentre crocante. Las hojas secas se trituran utilizando morteros de porcelana o equipos como molinos de cuchillas, licuadoras o trituradores de laboratorio. La muestra pulverizada se tamiza a un tamaño $<0.85 \text{ mm}$ para asegurar una digestión completa (Figura 5).



Figura 5. Preparación de muestras de hojas: secado, triturado y tamizado

Las mazorcas de cacao deben lavarse con agua de grifo para remover algún residuo del transporte, y luego se deben abrir preferentemente con un cuchillo plástico o cerámica inerte limpio y seco (de preferencia no utilizar elementos metálicos para evitar contaminar las muestras). Las almendras de cacao se

retiran de las mazorcas para iniciar el proceso de secado a 70 ± 5 °C durante 48 h en la estufa o hasta evidenciar que el material se encuentre seco.

Los resultados de almendra de cacao y cascarilla podrán ser expresados en mg Cd kg⁻¹ de material en peso seco.

Las almendras de cacao pueden llegar secas y fermentados o en mazorca. Cuando llegan en mazorca las almendras se colocan en un recipiente para posteriormente retirar el mucílago manualmente, una alternativa puede ser utilizando un colador de plástico para lavarlas con agua de grifo y retirar la mayor cantidad de mucílago, o se puede realizar manualmente almendra por almendra. Las almendras extraídas se secan a 70 ± 5 °C por 72 h en la estufa. Una vez transcurrido el tiempo de secado, se debe decidir si se retira o no la cascarilla o testa, este trabajo adicional agrega tiempo para la entrega de los resultados, pero mejora la precisión analítica (Figura 6). Es muy importante incluir en el reporte si los resultados representan a la concentración de Cd en almendras con o sin cascarilla.



Figura 6. Preparación de muestras de almendras de cacao: lavado, secado y tamizado

Si el material entregado al laboratorio supera el peso necesario para los análisis, se puede realizar un cuarteo del material con el fin de tomar una muestra representativa como se describe a continuación:

Extender el material sobre un papel Kraft en un lugar limpio y libre de contaminación, formado un círculo, posteriormente dividir en cuatro secciones, tomar dos secciones transversales, si la cantidad de material sigue siendo de gran tamaño, con los dos cuadrantes seleccionados anteriormente, se debe realizar nuevamente el proceso de cuarteo, hasta obtener la cantidad necesaria (Figura 7).

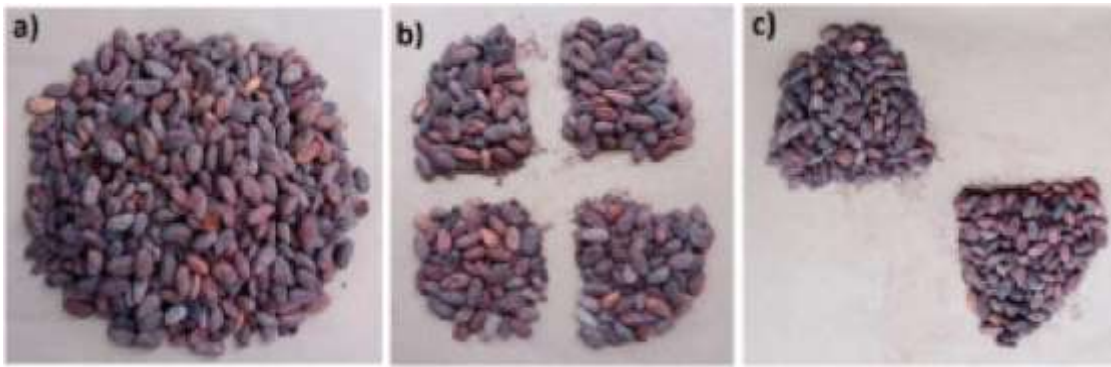


Figura 7. Elaboración de muestras compuestas y cuarteo. Fuente Rodríguez et al., 2022

Sección 2 - Condiciones Analíticas

El personal, el equipamiento, las condiciones ambientales, la calidad analítica de los reactivos, entre otros, difieren entre laboratorios y afectan la medición de Cd. Esto impacta directamente en el resultado obtenido asociado a su incertidumbre, por lo cual, es necesario identificar los principales aspectos que influyen en la calidad de los resultados y considerar estos factores al momento de realizar los análisis requeridos.

Personal, equipamiento, reactivos y condiciones generales de laboratorio

I. Personal

Se recomienda que todo el personal involucrado en el pretratamiento y análisis de las muestras conozcan la importancia de todas las actividades que se llevan a cabo y cuenten con capacitación y entrenamiento.

II. Equipamiento analítico

Comprende todos los equipos que están involucrados en el desarrollo del método analítico, estufas de secado, molinos, tamices, balanzas analíticas, equipos volumétricos, equipos de mineralización de las muestras e instrumentos de cuantificación analítica. Idealmente, estos equipos deben contar con un programa de mantenimiento, verificación y calibración (cuando aplique) y estar ubicados en un lugar libre de partículas (polvo, suelo, material vegetal, entre otros), de vibraciones, corrientes de aire y cualquier otro factor ambiental que pueda influir en el resultado final, para ello, se deben seguir las recomendaciones del manual de cada equipo, asegurando adicionalmente las condiciones ambientales de temperatura y humedad.

a. Balanza analítica de precisión

Este instrumento es muy importante, ya que los resultados son expresados en peso seco o en algunos casos en peso fresco. En este sentido, es necesario contar con una balanza analítica de precisión calibrada y verificada. Es recomendable tener un juego de pesas calibradas para revisar que la balanza esté funcionando perfectamente de forma rutinaria y tomar los correctivos en caso de que no sea así.

b. Mineralización

Una fuente importante de variación entre los laboratorios es el equipo utilizado para la digestión (mineralización o destrucción de materia orgánica) de la muestra. Este proceso se explicará a detalle en la sección 3 de este documento. El equipo utilizado en este proceso tiene como función tratar las muestras en un medio ácido con temperatura ($> 100\text{ }^{\circ}\text{C}$) y en algunos casos con el uso de presión. La temperatura, combinada con los ácidos, movilizará los elementos asociados a fracciones orgánicas y minerales, entre ellos el Cd. Para este fin, se utilizan equipos simples como planchas de calentamiento, digestores de bloque abiertos, o, más tecnológicos como los sistemas de digestión asistida por microondas (Figura 8). Para más información sobre los métodos de digestión y medición de elementos traza consultar en Lo Dico *et al.* (2018).

c. Cuantificación

De las técnicas más utilizadas para la cuantificación analítica están: Espectrometría de Absorción Atómica (AAS, por sus siglas en inglés), AAS con horno de grafito (GF-AAS), Espectrometría de Emisión Óptica por Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES), Espectrometría de Masas por Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS) y, muy recientemente, Fluorescencia de Rayos X (XRF). Este último equipamiento ha sido introducido como una alternativa para detectar Cd en muestras sólidas disminuyendo el tiempo desde el procesamiento hasta la obtención de los resultados. Debido a que es una tecnología aplicada recientemente para muestras de cacao, la descripción del uso de este instrumento no se incluirá en este documento.

Además de la tecnología utilizada, los equipos más empleados difieren, principalmente, en la precisión y la sensibilidad analítica reflejada en los límites de cuantificación de los métodos. AAS e ICP-OES han sido empleados para la medición de macro y micronutrientes, y, GF-AAS e ICP-MS para la detección de metales pesados y elementos trazas. Sin embargo, dado que la problemática de Cd en almendras de cacao ocurre en concentraciones superiores a los 0.10 mg kg^{-1} , el ICP-OES puede ser empleado de forma precisa para la detección de valores superiores al mencionado anteriormente (Rodríguez *et al.*, 2022).



Figura 8. Equipos analíticos (ICP-OES, ICP-MS) utilizados para la determinación de Cd y otros elementos

III. Calidad del agua

Una de las grandes limitantes en los laboratorios es asegurar agua de calidad para la preparación de estándares y dilución de muestras. Para el análisis de elementos traza, como Cd, es necesario el uso de agua ultrapura o tipo 1, especialmente para el lavado de material, dilución final de las muestras posterior al proceso de mineralización, preparación de soluciones extractoras y estándares usados en la calibración. El agua ultrapura debe tener una conductividad no mayor a los $0,056 \mu\text{S cm}^{-1}$. Este tipo de agua asegurará la calidad de los blancos analíticos, que se discutirá más adelante en la sección 4.

IV. Calidad de los reactivos

Los reactivos utilizados en el análisis deben ser de grado analítico, idealmente, de alta pureza (igual o superior al 99%). Este tipo de reactivos asegurarán una concentración de Cd suficientemente baja y ayudará (al igual que el agua) a obtener mejores blancos analíticos. Además, se evitará acarrear los elementos trazas en los

reactivos a lo largo de la medición, lo que llevaría a sobreestimar la concentración de Cd (y otros elementos traza). En los laboratorios donde cuenten con ICP-MS o GF-AAS, es clave el uso de ácidos y reactivos de alta pureza, como alternativas estos reactivos se pueden adquirir directamente con proveedores comerciales o se puede utilizar un destilador de ácidos (Figura 9) que permitirá mejorar la pureza de los reactivos analíticos.



Figura 9. Destilador de ácidos

Con respecto a la solución de Cd para calibración es necesario utilizar un estándar de Cd con concentración conocida suministrado por proveedores acreditados en ISO/IEC 17034, esto permitirá el uso de un material de referencia trazable metrológicamente a nivel internacional.

Sección 3 – Metodología analítica

En esta sección se detallarán los pasos a seguir en el laboratorio, desde el pesaje de las muestras hasta la cuantificación del analito de interés, con el fin de reportar la concentración de Cd en suelos y material vegetal. La metodología descrita para almendras de cacao puede emplearse con muestras de chocolate u otros subproductos de cacao, como el licor, sin embargo, se debe asegurar el porcentaje de recuperación del metal ya que cada muestra presenta una composición bioquímica particular.

Etapas:

- I. Determinación de humedad para suelo, almendras (con o sin testa de acuerdo a protocolos internos de cada laboratorio).
- II. Pesaje de muestras para cuantificación de Cd.
- III. Digestión ácida o mineralización de las muestras.
- IV. Cuantificación.
- V. Controles analíticos y de calidad.

I. Determinación de humedad

Los resultados de Cd podrán ser expresados de acuerdo con el fin previsto, mg de Cd por kg de material en peso seco o peso fresco, la expresión del resultado será de acuerdo con el servicio requerido y que se lleve a cabo o de acuerdo con la normativa de comparación.

Para fines de análisis de Cd en suelo normalmente se expresa en peso seco, como éste ha pasado por un proceso de secado parcial a una temperatura $< 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ los resultados se corrigen determinando humedad a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$; el material vegetal, como raíz, tallos, hojas y mazorca, normalmente también son expresados en peso seco a $70 \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$, sin embargo, las almendras y la cascarilla de cacao aunque también pueden expresarse los resultados en peso seco, como los resultados se comparan con la norma vigente de Cd para chocolate emitida por el Codex y la Unión Europea, los resultados se expresan en peso seco.

A continuación, se relacionan los pasos a seguir si se desean expresar los resultados corregidos por la humedad:

Suelo: Posterior al proceso de secado a una temperatura $< 40\text{ }^{\circ}\text{C}$, molido y tamizado a 2 mm, tomar una fracción entre 5 a 20 g de suelo y con ayuda de una estufa secar el material por 48 h a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$, tomar el peso inicial y final del suelo. Finalmente, proceder con el cálculo de humedad y corrección del resultado de Cd aplicando la ecuación 1 y 2 respectivamente:

Ecuación 1:

$$\% \text{ Humedad del suelo a } 105^{\circ}\text{C} (h) = \left[\frac{(\text{peso del suelo seco a } 40^{\circ}\text{C}) - (\text{peso del suelo seco a } 105^{\circ}\text{C})}{\text{peso del suelo seco a } 105^{\circ}\text{C}} \right] \times 100$$

Ecuación 2:

$$\text{mg Cd kg}^{-1} \text{ de suelo en peso seco} = \text{Cd mg kg}^{-1} * \left[\frac{(100 + h)}{100} \right]$$

Otra opción para determinar humedad en suelo o tejidos vegetales es utilizando una balanza de humedad la cual emitirá directamente el contenido de humedad de la muestra y con este valor se realiza la corrección de los resultados.

II. Pesaje de muestras

La masa de muestras secas que se analizará dependerá del tipo de equipamiento analítico que se utilice. Por ejemplo, si el laboratorio cuenta con equipamiento de alta sensibilidad como ICP-MS, la cantidad de muestra que se agrega puede ser de 100 mg (Argüello *et al.*, 2019) o 300 mg (Rodríguez *et al.*, 2022). Mientras que, si el laboratorio posee equipos menos sensibles como ICP-OES o AAS, se debe de incluir una mayor masa inicial, entre 350 y 500 mg para material vegetal y hasta 2 g para suelo (Chávez *et al.*, 2015) (Figura 10). La selección del peso inicial debe de considerar, además de la sensibilidad del instrumento analítico, la concentración de sólidos que permite el instrumento y la concentración esperada en la dilución final. Si la medición se realiza en un ICP-MS, la dilución final puede ser de 1:200 o superior (muestra:agua ultrapura). Si, por el contrario, la medición se realiza en un ICP-OES y se pesa inicialmente 350-500 mg, se recomienda que la dilución final no sea mayor a 1:75 (muestra:agua), pero dependerá del desarrollo y respuesta del método analítico.

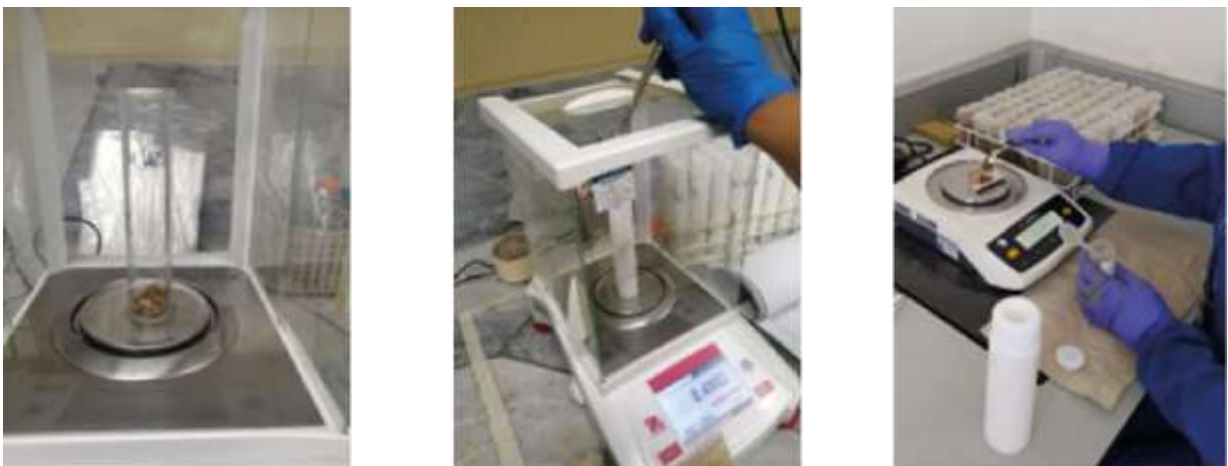


Figura 10. Pesaje de muestras en tubos de borosilicato para digestión abierta (izquierda) y teflón para digestión por horno microondas (derecha)

III. Digestión ácida o mineralización de muestras

Existen varios métodos para la mineralización de muestras de suelos y tejidos. Este paso consiste en transformar la muestra de un estado sólido a líquido movilizandolos elementos asociados al carbono y minerales de suelo. El método más común es el $\text{HNO}_3:\text{HCl}$ (3:1, v:v), también conocido como agua regia (Lo Dico *et al.*, 2018). En otros casos, también se utiliza H_2O_2 en alguna de las etapas de la mineralización, sobre todo cuando se trabaja con almendras para solubilizar las grasas (Barraza *et al.*, 2017). Algunos investigadores han utilizado solamente HNO_3 para mineralizar hojas, ya que es una matriz muy simple de digerir (Argüello *et al.*, 2020). En muestras de suelo, es común que los laboratorios realicen métodos de extracciones simples, que son menos laboriosos, menos peligrosos, y que pueden ser implementados a un mayor número de muestras por día (Chavez *et al.*, 2016). Algunos de los más comunes son 0.01 M CaCl_2 , 1 M DTPA, y Mehlich III. Sin embargo, existe discrepancia entre investigadores de qué método es más apropiado para cacao (ver por ejemplo lo propuesto en Chavez *et al.*, 2016; Gramlich *et al.*, 2018; Ramtahal *et al.*, 2015)

Dentro de las variaciones más comunes que se implementan en esta etapa está el ratio muestra:ácido(s). Este rango va a variar en función del tipo de muestra y del equipamiento del laboratorio. En general, el rango puede ir desde 1:20 a 1:60 (m:v), para ICP-OES y ICP-MS, respectivamente. Adicionalmente, la temperatura de digestión afectará el tiempo para evaporar el ácido adicionado a las muestras. En este sentido, usando temperaturas entre 80 – 100 °C se necesitarán entre 6 y 8 h para mineralizar las muestras, mientras que a temperaturas >120 °C requerirán menos tiempo para evaporar los ácidos (temperatura usualmente considerada como un indicador de digestión de muestras). Esto ocurrirá solo si las muestras son mineralizadas en un digestor abierto o una plancha de calentamiento (Figura 11). Si las muestras se mineralizan en un microondas, se requerirá el ajuste de temperatura y presión, y debe ser necesario una etapa de evaporación de ácidos (Anexo 2). Es recomendable realizar la evaporación de los ácidos después de la digestión de microondas, destapar los tubos de teflón y el contenido trasvasarlo a los tubos de borosilicato, lavar el primer tubo con agua tipo 1 y trasvasarlo al segundo tubo. Digerir en bloque abierto o placa de calentamiento hasta evaporación (volumen 1 mL), y así evitar acarrear un alto porcentaje de ácido a la cámara de nebulización del ICP-OES o ICP-MS. En algunas ocasiones, investigadores proponen usar rampas de temperatura para digerir suelo; esto es muy común encontrarlo en las configuraciones de los digestores de microondas. Sin embargo, el uso de rampas no es mandatorio y se debe de considerar solo si no existiera una digestión correcta de las muestras (ver la sección 4 de calidad analítica).

La digestión de material vegetal (raíz, tallos, hojas, mazorca, hojarasca, almendras o cascarilla) es mucho más homogénea que la digestión de los suelos. Las condiciones de digestión varían entre los laboratorios, pero se recomienda el uso de temperaturas > 90 °C por un tiempo mínimo de 4 h. Como agente oxidante se recomienda el uso de HNO_3 en un ratio de 10-25:1 (ácido:muestra, v:m). Además, se puede emplear un único ciclo de digestión y una sola rampa de temperatura.



Figura 11. Equipos usados para mineralizar muestras de suelo y tejido. Plancha calentadora y hornos microondas

Una vez digeridas las muestras, trasvasar el extracto mineralizado a un tubo graduado o un balón aforado provisto de un papel filtro cualitativo o cuantitativo (Ejemplo: Whatman 42), lavar con agua tipo 1 o ultrapura tanto el recipiente de digestión como el papel filtro por donde pasó la muestra mineralizada y posteriormente enrasar al volumen deseado y si es necesario trasvasar a tubos de 15 a 50 mL según sea el caso, para determinar el volumen final (Figura 12); para ello se debe considerar:

- 1) El límite de cuantificación teórico del equipo,
- 2) La masa inicial de la muestra digerida, y,
- 3) El ratio ácido:muestra utilizado.

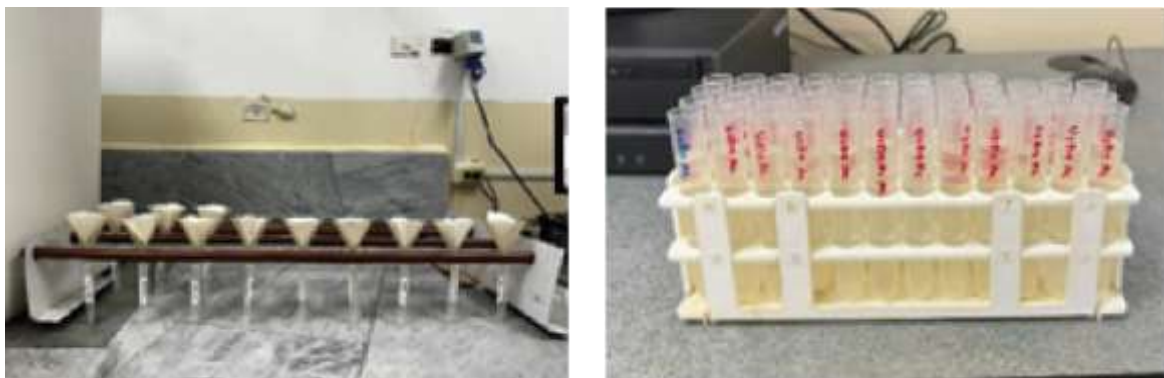


Figura 12. Filtrado y dilución de muestras para medición de cadmio (Cd) y otros elementos

IV. Cuantificación de cadmio y otros elementos

Una vez que las muestras han sido diluidas, el siguiente paso es calibrar el equipo de medición. Indistintamente del tipo de equipos utilizado, los laboratorios deben de considerar la concentración esperada de Cd en las muestras. En la Tabla 1, se describe las concentraciones de Cd medidas en más de 500 muestras colectadas por Argüello *et al.* (2019).

Tabla 1. Valores mínimos, máximos, mediana y cuartiles (Q1: 25 % y Q3: 75 %) de las concentraciones de cadmio (Cd) en muestras de suelos, hojas y almendras de cacao (Argüello et al., 2019)

Matriz	Concentración de cadmio (Cd) en mg kg ⁻¹				
	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
Suelo	0,02	0,20	0,33	0,54	6,90
Almendra	0,03	0,29	0,53	1,12	10,4
Hoja	0,13	0,77	1,45	2,84	55,5

Las curvas de calibración deben cubrir al menos el 75 % (Q3) del rango de estos datos (Chávez, 2021). La recomendación es que los puntos de calibración no superen el valor máximo de concentración de Cd de la Tabla 1, ya que el límite de cuantificación podría verse afectado. Esto asegurará que las cuentas de absorbancia/intensidad estén en relación con un rango de concentración realista, o se deberá realizar las diluciones pertinentes según sea el caso. La curva de calibración será elaborada al iniciar los análisis de cada día (Figura 13).

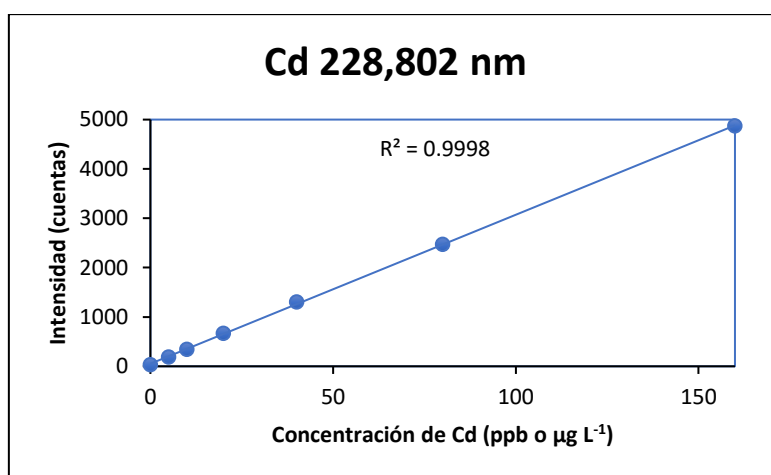



Figura 13. Curva de calibración de Cd

V. Controles analíticos y de calidad

La metodología de digestión, dilución y cuantificación de Cd en muestras de suelo y tejido puede variar entre laboratorios. Esta variabilidad de métodos es producto de la disponibilidad de reactivos y equipos, experiencia del personal de laboratorio, infraestructura, entre otros. Sin embargo, hay que estandarizar la utilización de sistemas de controles analíticos y de calidad (QA/QC), que permitan asegurar la calidad y fiabilidad de los resultados reportados. Los controles de calidad son aquellos pasos que se implementan en la etapa de procesamiento de la muestra, mientras que los controles analíticos están orientados a asegurar la cuantificación correcta del analito en la solución. Resumiendo, los controles analíticos son muestras que forman parte del proceso de pesaje, digestión y disolución de las




muestras, mientras que los controles de calidad están relacionados a la curva de calibración y soluciones contaminadas, sean estas certificadas o no, que se incluyen la medición.

Sección 4 – Control analítico y de calidad (QA/QC)

A continuación, se detallarán los componentes de un control de calidad (1 al 4) y control analítico (5 y 6), la frecuencia recomendada y el reporte de estos parámetros en un informe de laboratorio.


- 1) **Blanco del método:** consiste en adicionar en un tubo de digestión (para digester abierto o cerrado) todos los reactivos requeridos para el análisis y seguir cada una de las etapas de digestión y dilución hasta la cuantificación de Cd en la muestra. Es decir, el blanco reactivo o analítico contendrá todos los reactivos utilizados y pasos seguidos en la digestión, sin incluir la muestra a analizar. El objetivo es proporcionar información sobre la contaminación de los reactivos, de los tubos que contienen la muestra, o alguna contaminación cruzada que exista en el laboratorio. Además, se podrá evidenciar si existe un efecto matriz del metal en estudio. Los resultados de la cuantificación del blanco reactivo se pueden utilizar para el cálculo de los Límites de Cuantificación (LoQ) y Límites de Detección (LoD). Lo recomendable es incluir el análisis del blanco reactivo o analítico cada 10 o 20 muestras o de acuerdo a la secuencia de digestión que se maneje en cada equipo. El cálculo del LoD se obtiene multiplicando la concentración promedio del blanco analítico por 3 veces la desviación estándar de estos blancos analíticos ($LoD \pm 3 d$) y el LoQ multiplicando por 10 ($LoQ \pm 10 d$).
- 2) **Blanco de reactivos:** es una solución de agua ultrapura acidificada; normalmente se prepara como el blanco de la curva de calibración y **no contiene** el analito de interés. La importancia de este control es detectar contaminación en los conductos o en el sistema de inyección del equipo por el conocido “efecto memoria”. Se puede incluir como una muestra antes de la curva de calibración y como parte de ella.
- 3) **Réplicas o duplicados:** son determinaciones consecutivas de una misma muestra de forma independiente. Esta medición duplicada parte desde el proceso de medición de la masa, digestión, dilución y lectura de la concentración del analito en el equipo. La inclusión de réplicas permite calcular la variabilidad de las mediciones de Cd de laboratorio que puede expresarse como el coeficiente de variación (CV) en porcentaje o utilizando un criterio para evaluar duplicados (se puede consultar la guía Eurachem). Para el cálculo del CV es necesario contar con datos de al menos tres duplicados. Se puede utilizar la desviación estándar, la desviación estándar de la media o la desviación estándar relativa, todas incluidas en la función “*fórmula*” en Excel. Cualquiera de las medidas empleadas puede multiplicarse por 100 para ser expresadas como porcentajes, lo cual facilitará la interpretación en el reporte. Las muestras en duplicado deben ser incluidas cada



10 o 15 muestras, o de acuerdo a la secuencia de análisis que se maneje en el laboratorio.

- 4) **Materiales de control interno o materiales de referencia interno (MRI):** son muestras preparadas por el mismo laboratorio cuya concentración nominal **no está certificada** por un instituto acreditado. Estas muestras son homogenizadas y tamizadas, y la concentración de Cd es medida varias veces en el tiempo para asegurar la precisión de la medición. Con los datos generados, se asigna un valor promedio y un rango aceptable (± 1 o 2 d) para efectos de comparación. Estos materiales sirven para calcular el porcentaje de recuperación o la precisión de la medida con respecto al promedio calculado, de los **materiales no certificados** y se pueden incluir cada 15 muestras o según lo estime el laboratorio. Es necesario que el material de referencia utilizado sea de la misma matriz que el material analizado y se recomienda el uso de cartas control para revisar el comportamiento de la técnica el día del análisis y el comportamiento entre días. Si existe algún material que presente una desviación superior a 2, se recomienda preparar nuevamente la muestra junto con una muestra al azar de la secuencia que acompaña dicho material, es decir, si el MRI se analiza cada 15 muestras se deberá analizar nuevamente el MRI que presentó una desviación superior o inferior a 2 desviaciones y una muestra que se encuentre dentro de las 15 muestras desconocidas siguientes al material. Esto permitirá evaluar si el no cumplimiento se debe específicamente al MRI, o si el error está asociado al método analítico. Si continúa incumpliendo, se recomienda parar y analizar las causas del incumplimiento. Allí se debe revisar desde el proceso de pesaje hasta cuantificación. Posteriormente se recomienda analizar todas las muestras que fueron afectadas.
- 5) **Materiales de referencia certificados (MRC):** son muestras homogéneas que contienen una concentración **certificada** del analito de interés. Los MRC son elaborados por organismos acreditados en ISO/IEC 17043 para emitir materiales trazables a nivel internacional; entre los más conocidos están: National Institute of Standard and Technology (NIST, USA) y el Joint Research Centre (JRC, European Commission). Los MRCs portan un documento donde constan los elementos certificados (\pm incertidumbre) y elementos referenciales que no son certificados por el fabricante, pero que sirven para referenciar elementos. Estos MRCs deben de incluirse en el análisis como una muestra convencional (con todos los reactivos y etapas requeridas) hasta llegar a determinar el analito de interés, en nuestro caso, Cd. Como es un material certificado, el resultado del análisis debe de compararse con el valor certificado (\pm incertidumbre) y calcular el porcentaje de “recuperación” en la matriz de interés usando la ecuación 3:

$$\text{Ecuación 3: } \% \text{ Recuperación} = \left[\frac{Cd_{med}}{Cd_{CRM}} \right] \times 100$$



Donde Cd_{med} es el Cd obtenido por el laboratorio siguiendo las metodologías internas y Cd_{CRM} es el Cd certificado en el CRM. Idealmente, en dependencia del número de muestras por lote de análisis, se deben incluir 1 CRM por cada 15 muestras o de acuerdo como lo defina el laboratorio en su rutina de análisis. El laboratorio deberá mantener un historial de los % de recuperación para Cd y elementos de interés, para ello, se recomienda utilizar cartas control de seguimiento. Por otro lado, se recomienda si es necesario corregir el valor por la humedad ya que es un punto crítico a la hora de evaluar veracidad de la medición. Para la selección de los MRCs es necesario considerar que la matriz del material y la concentración certificada sean similares a las muestras que se van a analizar o cercanas. En el caso del cacao y chocolate, tanto el NIST como JRC cuentan con materiales que pueden incorporarse en el análisis. Hay que considerar que la concentración del MRC esté en el rango que se espera en las muestras a analizar (tabla 1) ya que una concentración mayor del MRC podría crear una “falsa” sensación de seguridad analítica. En la Tabla 2, se presenta una lista de MRCs disponibles al momento y que pueden ser incluidos en un protocolo de QA/QC para análisis de Cd en muestras de suelos, hojas y almendras de cacao. Vale la pena mencionar que los organismos acreditados para elaborar los MRCs actualizan constantemente los materiales disponibles, por lo que la lista de la tabla 2 puede verse modificada en algún momento.

- 6) **Muestra contaminada (agua) o punto control con concentración conocida:** para el control analítico se recomienda también utilizar un punto control de $mg L^{-1}$ de Cd^2 . Consiste en preparar una solución con una concentración conocida del analito, usando un estándar con una concentración diferente a la seleccionada para la curva de calibración. La concentración de la solución empleada debe de estar dentro del rango de calibración del equipo, es decir, la concentración no es ninguno de los puntos de la Figura 13, pero sí está dentro el punto máximo y mínimo de esta figura. Este control permite evaluar la consistencia de la curva de calibración, así como posibles contaminantes que conllevan a un error de cuantificación positivo cuando se detecta una concentración más alta de la esperada o una recuperación baja. La solución de control puede ser preparada a partir de un estándar concentrado diferente al utilizado para elaborar los estándares de calibración; a esto se lo conoce como “estándar secundario”.

- 7) **Contramuestras:** Una parte de las muestras analizadas deben ser custodiadas en ambientes que garanticen su integridad (temperatura, humedad, radiación), para el caso en que el usuario (cliente o investigador) requiera un re-análisis o el laboratorio requiera realizar un control de calidad. La contramuestra también puede servir para preparar los materiales de referencia internos, como se mencionó en los puntos anteriores. Sin embargo, no siempre es posible guardar

² Es altamente beneficioso que la solución puede ser adquirida en NIST o JRC como CRM, esto queda a criterio del laboratorio en dependencia del presupuesto disponible.

contramuestras ya que el peso de la muestra entregada al laboratorio puede ser muy bajo (usualmente en investigación en ensayos de invernadero). En esos casos se recomienda informar al solicitante que no quedará contramuestra en caso de que se requiera un re-análisis. En lo posible, siempre se debe intentar mantener la contramuestra. El tiempo de almacenamiento deberá ser definido por el laboratorio y dependerá del espacio y del manejo interno.

Tabla 2. Materiales de Referencia Certificados (MRCs) que pueden ser utilizados como parte del QA/QC en suelos, hojas y almendras de cacao.

Matriz	Nombre	Código	Proveedor	Peso (g)	Concentración de cadmio (mg kg ⁻¹)	Sitio web de consulta
Suelo	San Joaquín	SRM 2709 ^a	NIST	50	0,371	https://shop.nist.gov/ccrz__ProductDetails?sku=2709a&cclcl=en_US
Suelo	Light Sand	BCR - 142R	JRC	50	0,34	https://crm.jrc.ec.europa.eu/p/40454/40470/By-application-field/Environment/BCR-142R-LIGHT-SANDY-SOIL-trace-elements/BCR-142R
Suelo	Loamy soil	ERM-CC141	JRC	20	0,35	https://crm.jrc.ec.europa.eu/p/q/soil/ERM-CC141-LOAM-SOIL-elements/ERM-CC141
Hoja	Tomato leaves	SRM 1573 ^a	NIST	50	1,517	https://shop.nist.gov/ccrz__ProductDetails?sku=1573a&cclcl=en_US
Hoja	Spinach leaves	SRM 1570 ^a	NIST	60	2,876	https://shop.nist.gov/ccrz__ProductDetails?sku=1570a&cclcl=en_US
Chocolate	Dark chocolate	ERM-BD512	JRC	3	0,302	https://crm.jrc.ec.europa.eu/p/q/CHOCOLATE/ERM-BD512-DARK-CHOCOLATE-Cd-Cu-Mn-Ni/ERM-BD512
Chocolate	Baking chocolate	SRM 2384	NIST	455	0,0734	https://shop.nist.gov/ccrz__ProductDetails?sku=2384&cclcl=en_US
Cocoa powder	Cocoa	ERM [®] -BD514 y ERM [®] -BD515	BAM-ERM	8	0,541 y 0,690, respectivamente	https://webshop.bam.de/media/wysiwyg/Kategorien/Referenzmaterialien/Lebensmittel/Cadmium-und-Acrylamid-in-Kakao/Berichte/erm_bd513_15repe.pdf

Sección 5 – Interpretación de los resultados

Para establecer los mecanismos de mitigación de Cd en las zonas contaminadas, es necesario realizar una interpretación correcta de los resultados de laboratorio. A continuación, se ofrece una guía **referencial** para la interpretación de los reportados por los laboratorios.

Es importante recalcar que Cd tiene una gran heterogeneidad de distribución, tanto en el suelo como en los diferentes componentes de la planta. Además, esta variabilidad puede ser espacial (depende del tamaño de la finca) o temporal (dependiendo de la época de toma de muestras). Estos factores deben de ser considerados al momento de la interpretación.

I. Suelos y almendra de cacao

Es la matriz que presenta mayor variabilidad en el laboratorio para la cuantificación de Cd. Esto se debe en parte a la metodología utilizada para el análisis de la concentración del metal, ya que esta puede variar de acuerdo con los reactivos, procedimientos de digestión y con los equipos de cada laboratorio. La mayoría de los laboratorios de la región realizan extracciones simples para detectar Cd y otros elementos.


Aún no existe una metodología establecida para evaluar el Cd fitodisponible en suelo, por lo que esta guía hace referencia al Cd pseudo total del suelo.

Otro aspecto que considerar es el pH de suelo. En diversos estudios se ha reportado una relación entre la fitodisponibilidad de Cd y pH de suelos ácidos ($\text{pH} < 5.5$). A mayor pH en el suelo ($\text{pH} > 6.5$), ocurren reacciones de hidrólisis y de coprecipitación, lo que provoca una inmovilización de los metales en el suelo (Ramtahal *et al.*, 2019). Finalmente, se debe tomar en cuenta el efecto de la materia orgánica de suelo (MOS). La materia orgánica es una mezcla de compuestos aromáticos y alifáticos con una gran cantidad de grupos funcionales que tienen alta afinidad con los metales, como el Cd. A mayor contenido de MOS, menor será la concentración de Cd fitodisponible.

La mejor manera de interpretar el contenido de Cd en un análisis de suelo para conocer la concentración de Cd en la almendra de cacao es utilizando la información reportada en Vanderschuere *et al.* (2021), especialmente, la ecuación 4:

Ecuación 4:

$$\log_{10}(\text{Cd}_{\text{alm}}) = 1.34 + [0.86 * \log_{10}(\text{Cd}_{\text{sue}})] - (0.18 * \text{pH}_{\text{CaCl}_2}) - [0.25 * \log_{10}(\text{SOC})]$$



Donde Cd_{alm} es la concentración de Cd en almendras, Cd_{sue} es la concentración de Cd en suelos, $0.18 * pH_{CaCl_2}$ el pH de suelo medido con una solución de 0.01 M $CaCl_2$, y COS el carbono orgánico de suelos (se puede derivar dividiendo la materia orgánica por 1.72). Las concentraciones de Cd en almendras y suelo, así como el contenido de COS, son transformados con logaritmo en base 10 (\log_{10}). Es decir, si queremos conocer el contenido potencial en las almendras, utilizando datos de suelo, los valores de Cd en suelo y SOC deben de ser transformado a \log_{10} . Por ejemplo, si en el informe de laboratorio se reportan los siguientes valores de una muestra de suelo:

- $pH_{CaCl_2} = 5.1$
- $Cd_{pseudototal} = 0.42 \text{ mg Cd kg}^{-1}$
- $COS = 1.07 \text{ g } 100^{-1}$

Lo primero que se debe realizar es la transformación de Cd pseudototal y COS a valores logarítmicos, los cuales son:

- $\text{Log}(Cd_{pseudototal}) = -0.38$
- $\text{Log}_{COS} = 0.03$

Reemplazando estos valores en la ecuación, el resultado de $\log_{10}(Cd_{alm})$ sería el siguiente:

- $\log_{10}(Cd_{alm}) = 1.34 + (-0.32) - (0.92) - (0.0075)$
- $\log_{10}(Cd_{alm}) = 0.092$

Esta concentración correspondería al \log_{10} de Cd en almendras por lo que hay que aplicar el antilogaritmo en base 10 para transformar el valor a la concentración potencial.

- $10^{\log_{10}(Cd_{alm})} = 10^{0.092}$
- $Cd_{alm} = 1.24$

Es decir, con los parámetros de suelos enviados por el laboratorio, la concentración de Cd en almendras supera el 0.80 mg kg^{-1} y potencialmente podría verse perjudicada la comercialización a mercados regulados, actualmente no existe una norma donde se declare los límites máximos permitidos (LMP) de Cd en almendra de cacao, pero se recomienda tener como soporte los LMP declarados por el Codex y la Unión Europea para chocolate, o consultar directamente con el cliente si tiene una concentración permitida para la comercialización.

El uso de esta ecuación viene con un error intrínseco por lo que hay que tomar este valor como **referencial**, siempre será mejor, y más directo, realizar la interpretación con muestras de almendras.

II. Almendras y hojas

En las almendras y las hojas igual que el suelo, la variabilidad espacial y temporal pueden interferir negativamente en una interpretación certera.


Desde el punto de vista analítico, en los resultados de la cuantificación de Cd, no debería haber mayor variabilidad entre los laboratorios (< 10 %), esto bajo la premisa que se realizó un muestreo adecuado, y se llevaron a cabo protocolos de QA/QC que permitan la comparación entre los laboratorios. En todo caso, la cuantificación de Cd en material vegetal nos da una medida precisa de la absorción/acumulación/translocación de Cd en la planta, y no un valor referencial como el cálculo realizado en el acápite anterior para el suelo.

Vale la pena recordar que las regulaciones actuales se las realizan en chocolate vendido al consumidor final y no en almendras de cacao o productos intermedios como el licor. Sin embargo, los “traders” de cacao implementan límites comerciales que van desde 0.50 a 1.00 mg de Cd kg⁻¹ de cacao seco. Se recomienda a los laboratorios, incluir rangos de Cd en los reportes enviados, para facilitar la interpretación a los usuarios. Los rangos pueden ser: sin riesgo < 0,60, riesgo moderado > 0,60 y < 0,80, riesgo moderadamente elevado > 0,80 < 1,20, riesgo elevado > 1,20 mg kg⁻¹. Estos rangos son recomendados dada la experiencia del grupo que elabora la presente nota técnica.

En caso de que la plantación a muestrear no cuente con mazorcas maduras, se pueden utilizar la concentración de Cd en hojas como un aproximado de Cd en almendras. Argüello *et al.* (2019) y Barraza *et al.* (2017), encontraron una correlación significativa ($r > 0,80$, $p < 0,01$) entre la concentración de Cd en las hojas y en las almendras. En promedio, la concentración de Cd en hojas es 3 veces superior que en las almendras. Con esta información, podríamos inferir que, para obtener una concentración de 0,80 mg de Cd kg⁻¹ en las almendras, las hojas no deberán superar los 2,40 mg de Cd kg⁻¹. Hay que tener cierto cuidado con esta extrapolación ya existe variedades que pueden acumular igual Cd en hojas que en almendras (Lewis *et al.*, 2018).


Referencias Bibliográficas

- Alderete-Suárez, B. M., Valles-Aragón, M. C., Canales-Reyes, S., del Rosario Peralta-Pérez, M., & Orrantia-Borunda, E. (2019). Bioconcentración de Pb, Cd y As en biomasa de *Eleocharis macrostachya* (Cyperaceae). *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 35, 93-101.
- Argüello, D., Chavez, E., Laurysen, F., Vanderschueren, R., Smolders, E., & Montalvo, D. (2019). Soil properties and agronomic factors affecting cadmium concentrations in cacao beans: A nationwide survey in Ecuador. *Science of the Total Environment*, 649, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.292>
- Argüello, D., Montalvo, D., Blommaert, H., Chavez, E., & Smolders, E. (2020). Surface soil liming reduces cadmium uptake in cacao seedlings but subsurface uptake is enhanced. *Journal of Environmental Quality*, 49(5), 1359–1369. <https://doi.org/10.1002/jeq2.20123>
- Barraza, F., Schreck, E., Lévêque, T., Uzu, G., López, F., Ruales, J., Prunier, J., Marquet, A., & Maurice, L. (2017). Cadmium bioaccumulation and gastric bioaccessibility in cacao: A field study in areas impacted by oil activities in Ecuador. *Environmental Pollution*, 229, 950–963. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.080>
- Bravo, D. and Braissant, O. (2022), Cadmium-tolerant bacteria: current trends and applications in agriculture. *Letters in Applied Microbiology*, 74: 311-333. <https://doi.org/10.1111/lam.13594>
- Bravo, D.; Leon-Moreno, C.; Martínez, C.A.; Varón-Ramírez, V.M.; Araujo-Carrillo, G.A.; Vargas, R.; Quiroga-Mateus, R.; Zamora, A.; Rodríguez, E.A.G. The First National Survey of Cadmium in Cacao Farm Soil in Colombia. *Agronomy* 2021, 11, 761. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040761>
- Chávez, E. (2021). Guía 6: Control de las condiciones analíticas de los laboratorios para la determinación de cadmio e interpretación de los resultados en suelos y tejidos de cacao. Caja de herramientas para la prevención y mitigación de la contaminación de cadmio en la cadena de cacao-Ecuador (1.ª ed., pp. 1-24). Quito, Ecuador. https://balcon.mag.gob.ec/mag01/magapaldia/Caja%20de%20Herramientas_Cadmio_Cacao/
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.013>
- Chavez, E., He, Z. L., Stoffella, P. J., Mylavarapu, R. S., Li, Y. C., Moyano, B., & Baligar, V. C. (2015). Concentration of cadmium in cacao beans and its relationship with soil

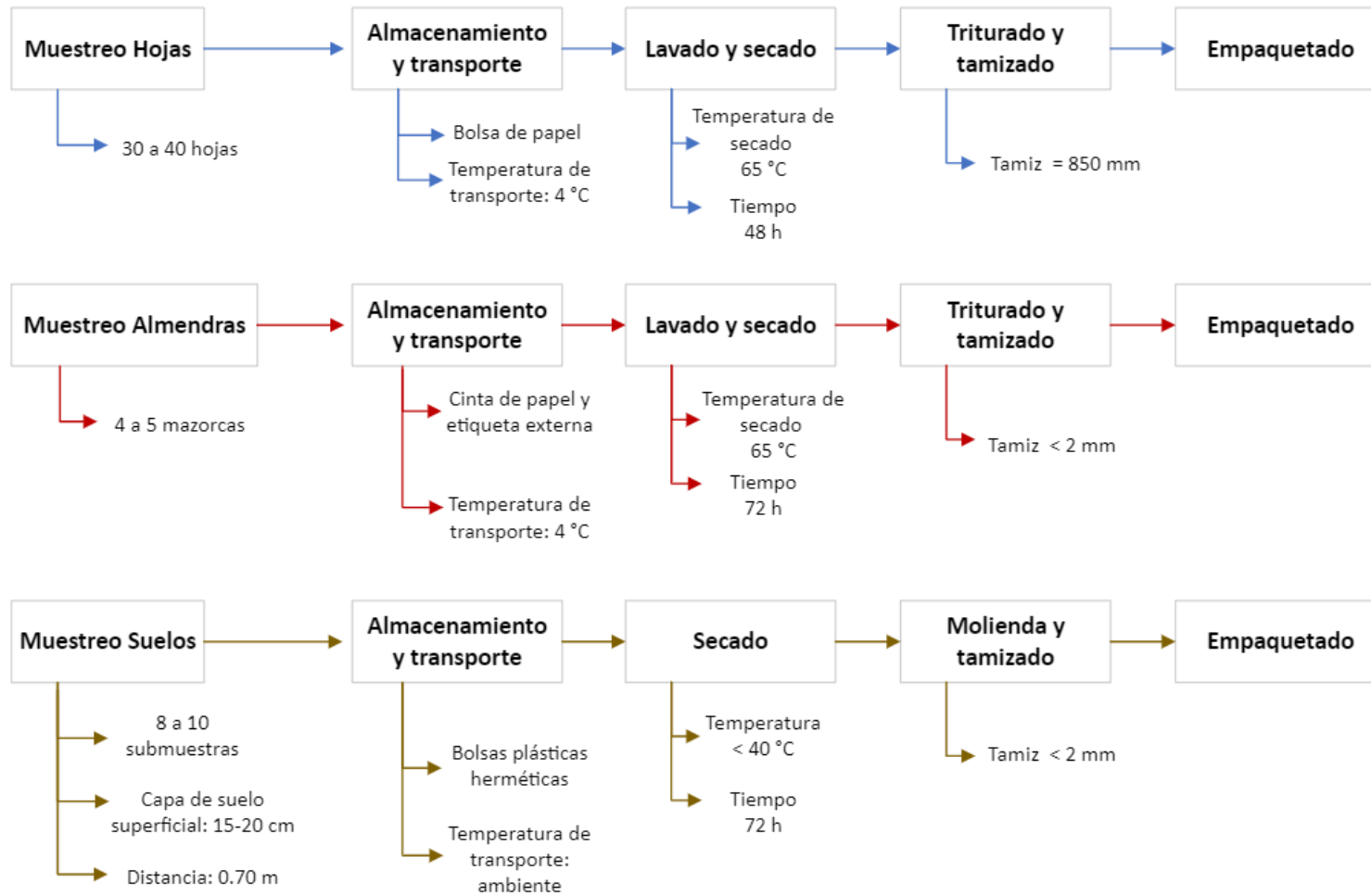


cadmium in southern Ecuador. *Science of the Total Environment*, 533. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.106>

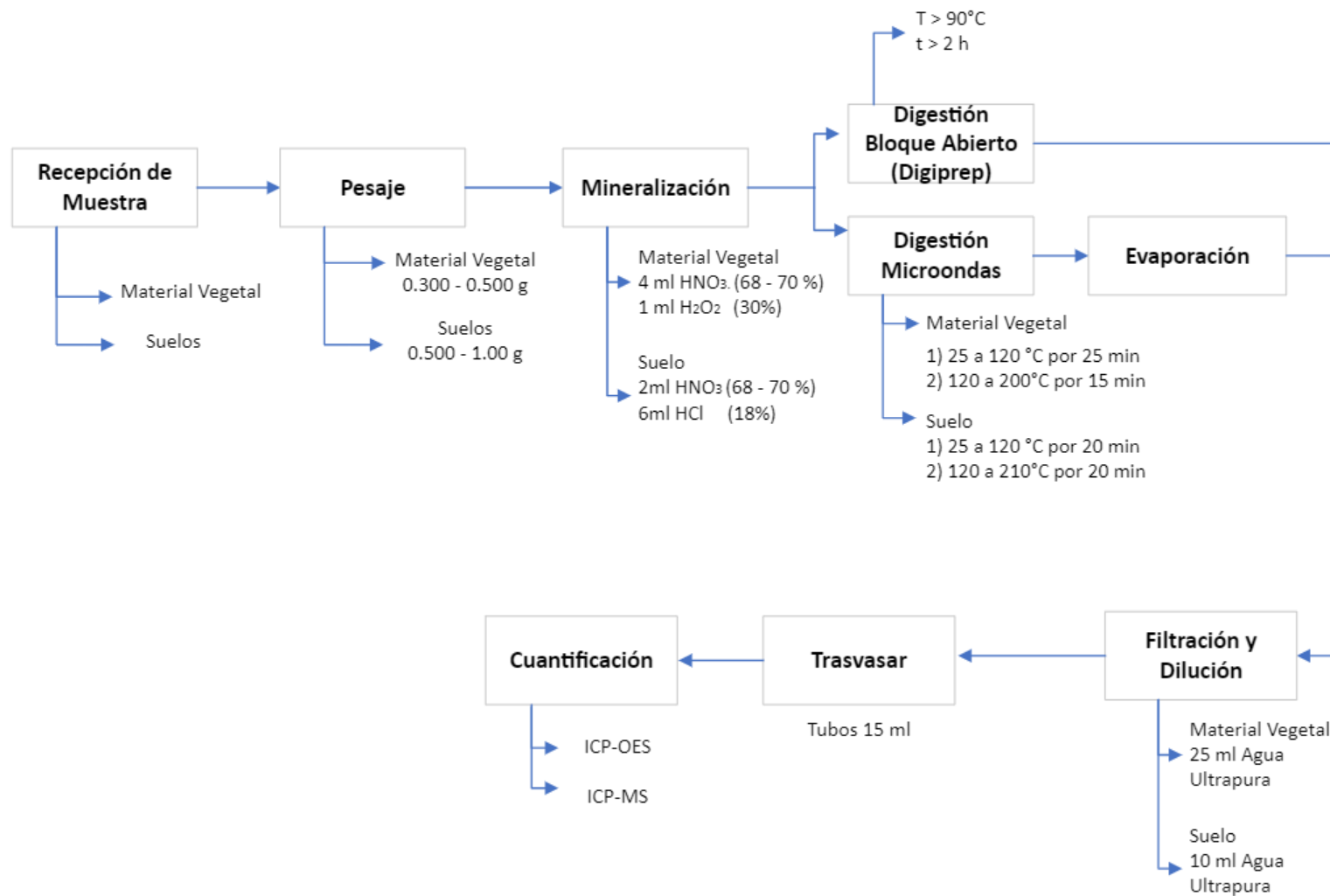
- El Rasafi, T., Oukarroum, A., Haddioui, A., Song, H., Kwon, E. E., Bolan, N., ... & Rinklebe, J. (2022). Cadmium stress in plants: A critical review of the effects, mechanisms, and tolerance strategies. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 52(5), 675-726.
- Gil, J.P., López-Zuleta, S., Quiroga-Mateus, R.Y. et al. Cadmium distribution in soils, soil litter and cacao beans: a case study from Colombia. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 19, 2455–2476 (2022). <https://doi.org/10.1007/s13762-021-03299-x>
- Giraldo, Y. R., Sánchez, E. R., Torres, L. G., Montenegro, A. C., & Pichimata, M. A. (2022). Development of validation methods to determine cadmium in cocoa almond from the beans by ICP-MS and ICP-OES. *Talanta Open*, 5, 100078.
- Kabata-Pendias, A. (2010). *Trace Elements in Soils and Plants*. CRC Press, 4 edition.
- Lewis, C., Lennon, A. M., Eudoxie, G., & Umaharan, P. (2018). Genetic variation in bioaccumulation and partitioning of cadmium in *Theobroma cacao* L. *Science of the Total Environment*, 640–641, 696–703. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.365>
- Lo Dico, G. M., Galvano, F., Dugo, G., D’ascenzi, C., Macaluso, A., Vella, A., Giangrosso, G., Cammilleri, G., & Ferrantelli, V. (2018). Toxic metal levels in cocoa powder and chocolate by ICP-MS method after microwave-assisted digestion. *Food Chemistry*, 245(November 2017), 1163–1168. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.052>
- Oliveira, B. R. M., De Almeida, A. A. F., de Almeida Santos, N., & Pirovani, C. P. (2022). Tolerance strategies and factors that influence the cadmium uptake by cacao tree. *Scientia Horticulturae*, 293, 110733.
- Ramtahal, G., Umaharan, P., Hanuman, A., Davis, C., & Ali, L. (2019). The effectiveness of soil amendments, biochar and lime, in mitigating cadmium bioaccumulation in *Theobroma cacao* L. *Science of the Total Environment*, 693, 133563.
- Ramtahal, G., Yen, I. C., Ahmad, N., Bekele, I., Maharaj, K., Wilson, L., Harrynanan, L., Ramtahal, G., Yen, I. C., Ahmad, N., Bekele, I., Bekele, F., Maharaj, K., Wilson, L., Prediction, L. H., Ramtahal, G., Yen, I. C., Ahmad, N., Bekele, I., ... Wilson, L. (2015). Prediction of Soil Cadmium Bioavailability to Cacao (*Theobroma cacao* L .) using Single-Step Extraction Procedures Prediction of Soil Cadmium Bioavailability to Cacao (*Theobroma cacao* L .) using Single-Step Extraction Procedures. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 3624. <https://doi.org/10.1080/00103624.2015.1089262>
- Rodríguez Giraldo, Y., Rodríguez Sánchez, E., Torres, L. G., Montenegro, A. C., & Pichimata, M. A. (2022). Development of validation methods to determine

- 
- cadmium in cocoa almond from the beans by ICP-MS and ICP-OES. *Talanta Open*, 5. <https://doi.org/10.1016/j.talo.2021.100078>
- Shaari, N. E. M., Tajudin, M. T. F. M., Khandaker, M. M., Majrashi, A., Alenazi, M. M., Abdullahi, U. A., & Mohd, K. S. (2022). Cadmium toxicity symptoms and uptake mechanism in plants: a review. *Brazilian Journal of Biology*, 84.
- Six, L., & Smolders, E. (2014). Future trends in soil cadmium concentration under current cadmium fluxes to European agricultural soils. *Science of the Total Environment*, 485–486(1), 319–328. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.109>
- Sterckeman, T., & Thomine, S. (2020). Mechanisms of cadmium accumulation in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 39(4), 322-359.
- Sun, S. K., Chen, J., & Zhao, F. J. (2023). Regulation of sulfur metabolism for tolerance and accumulation of toxic trace metals and metalloids in plants. *Journal of Experimental Botany*, erad074.
- Thomas, E., Atkinson, R., Zavaleta, D., Rodriguez, C., Lastra, S., Yovera, F., ... & Ladd, B. (2023). The distribution of cadmium in soil and cacao beans in Peru. *Science of The Total Environment*, 881, 163372.
- Vanderschueren, R., Argüello, D., Blommaert, H., Montalvo, D., Barraza, F., Maurice, L., Schreck, E., Schulin, R., Lewis, C., Luis, J., Umaharan, P., Chavez, E., Sarret, G., & Smolders, E. (2021). Mitigating the level of cadmium in cacao products : Reviewing the transfer of cadmium from soil to chocolate bar. *Science of the Total Environment*, 781, 146779. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146779>
- Vega Martínez, M. A. (2022). *Determinación de cadmio por espectroscopía de absorción atómica en suelos de cultivo de cacao, provenientes de la parroquia Convento, Chone-Manabí* (Bachelor's thesis, Quito: UCE).
- Yanus, R. L., Sela, H., Borojovich, E. J. C., Zakon, Y., Saphier, M., Nikolski, A., Gutflais, E., Lorber, A., & Karpas, Z. (2014). Trace elements in cocoa solids and chocolate: An ICPMS study. *Talanta*, 119, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.10.048>
- Yao, W., Yang, Z., Huang, L., & Su, C. (2022). Complexation of amino acids with cadmium and their application for cadmium-contaminated soil remediation. *Applied Sciences*, 12(3), 1114.
- Zhan, J., Huang, H., Yu, H., Zhang, X., Wang, Y., & Li, T. (2020). Characterization of dissolved organic matter in the rhizosphere of phytostabilizer *Athyrium wardii* (Hook.) involved in enhanced metal accumulation when exposed to Cd and Pb co-contamination. *Environmental Pollution*, 266, 115196.

Anexo 1. Diagrama de flujo del procedimiento inicial



Anexo 2. Diagrama de flujo de la metodología analítica



Instituciones Participantes



Instituto Nacional de Innovación y
Transferencia en Tecnología Agropecuaria



Secretaría Técnica Administrativa



Con el apoyo de:



www.fontagro.org

Correo electrónico: fontagro@fontagro.org