

Desarrollo y validación de un método analítico para la determinación de cadmio en cocoa en polvo y preparada con leche. Aplicación en productos del mercado local

Development and validation of an analytical method for the determination of cadmium in cocoa powder and cocoa powder prepared with milk. Application to products of the local market

Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para a determinação de cadmio em cacau em pó e preparado com leite. Aplicação em produtos do mercado local

 NATALY RODRÍGUEZ (1)

 JAVIER SILVA (1)

 FIORELLA IAQUINTA (1)

 MARIELA PISTÓN (1)

(1) Química Analítica, Departamento Estrella Campos, Facultad de Química, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

RECIBIDO: 14/3/2023 → APROBADO: 14/4/2023 ✉ natalyr@fq.edu.uy

RESUMEN

Existe una creciente preocupación respecto al contenido de cadmio (Cd) en los productos derivados del cacao, como la cocoa en polvo; lo que ha llevado al establecimiento de valores de ingesta máxima tolerable de este metal y a la disminución de los niveles máximos (NM) aceptados. En este sentido, es necesario realizar un control sobre los niveles de Cd en estos alimentos, contando con métodos analíticos confiables y amigables con el medio ambiente. Con ese objetivo se desarrolló y validó un método analítico para la determinación de Cd en cocoas puras y en su preparación con leche, la forma de consumo más popular en nuestro país. El método resultó adecuado para el fin definido y presentó como ventaja un menor consumo de ácidos concentrados que el método de referencia de la AOAC International (2016b). Se aplicó para un sondeo del contenido de Cd en muestras disponibles en el mercado local de Montevideo, Uruguay. Si bien todas las muestras tuvieron concentraciones detectables de Cd, resultaron inferiores al NM establecido.

Palabras clave: contaminantes inorgánicos, espectrometría atómica, seguridad alimentaria.

ABSTRACT

There is a growing concern regarding the cadmium (Cd) levels in cacao products and cocoa derivatives. This concern led to the establishment of a tolerable intake and to decrease of the maximum levels (ML). For this reason, levels of Cd on these foods need to be monitored and it is necessary to have reliable and environmentally friendly analytical methods. To fit with this purpose, an analytical method for the determination of Cd in cocoa powder and its preparation with milk was developed and validated. The method turned out to be adequate for the objectives, with the advantage of a minor consumption of acid during the sample preparation that the AOAC International (2016b). This method was applied for the determination of Cd concentration in samples from the local market in Montevideo, Uruguay. Although all samples have a detectable Cd concentration, all were below the maximum levels accepted.

Keywords: inorganic contaminants, atomic spectrometry, food safety.

RESUMO

Nos últimos anos tem aumentado a preocupação respeito ao conteúdo de cádmio (Cd) nos produtos derivados do cacau, como por exemplo, o cacau em pó. Essa preocupação levou a fixar uma ingestão máxima tolerável do metal e a diminuir os níveis máximos (NM) aceitos. Por esses motivos, torna-se necessária a realização de controles dos níveis de Cd nos alimentos mencionados, e para isto, contar com metodologias analíticas de confiança e amigáveis com o meio ambiente. Com esse objetivo se desenvolveu e validou uma metodologia para a determinação de Cd em cacau em pó puro e preparado com leite, principal forma de consumo no nosso país. A metodologia provou-se adequada para o fim proposto e apresentou como vantagem um menor consumo de ácidos concentrados em comparação com a metodologia oficial da AOAC International (2016b). A metodologia foi aplicada na realização de uma sondagem da quantidade de Cd em amostras do mercado local da cidade de Montevideo, Uruguai. Embora todas as amostras tiveram concentrações detectáveis de Cd, todas foram inferiores ao NM estabelecido.

Palavras-chave: contaminantes inorgânicos, espectrometria atômica, segurança alimentar.

INTRODUCCIÓN

El cacao (fruto de la planta *Theobroma cacao* L.) y sus productos derivados son ampliamente consumidos a nivel mundial. El cultivo del cacao es una práctica tradicional y de suma relevancia para el comercio en varios países de América Latina y el Caribe (LAC) (Alcívar et al., 2022). Esta práctica se realiza desde Brasil hasta México y ocupa cerca de 1,8 millones de hectáreas en la región (Sánchez Arizo et. al, 2019).

El consumo regular y moderado de cacao o sus derivados ha sido relacionado con beneficios para la salud debido a su alto contenido de polifenoles, como los flavonoides. Se ha reportado que su ingestión tiene un papel relevante en la prevención y el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, y sobre la resistencia a la insulina, entre otros efectos

benéficos (Hooper et al., 2012). Sin embargo, existe preocupación respecto al aporte a la dieta humana de metales potencialmente tóxicos que podrían contener estos alimentos, ya que la planta de donde se obtiene el cacao es capaz de acumular diversos metales (Chavez et al., 2016). Un contaminante inorgánico que ha ganado relevancia en los últimos años es el cadmio (Cd), cuya presencia en las distintas partes de la planta ocurre en mayor o menor medida, dependiendo de factores como el tipo de suelo y la utilización de fertilizantes fosforados, entre otros (Gramlich et al., 2017).

El Cd es un metal que no tiene ninguna función biológica en los seres vivos. Está presente en el ambiente debido al aporte de fuentes naturales, como la actividad volcánica, y fuentes antropogénicas, como la quema de combustibles, la minería, la manufactura y el uso de fertilizantes que contienen Cd (World Health Organization, 2019). También se utiliza en la industria de pinturas, plásticos, soldaduras y compone las baterías de níquel-cadmio (Alcívar et al., 2022).

La ingesta es la principal vía de exposición al Cd. Y si bien la absorción gastrointestinal de este elemento es baja -aproximadamente 5 % (Godt et al., 2006; Vanderschueren et al., 2022)-, la preocupación respecto a este contaminante ha crecido en los últimos años. La exposición crónica al metal puede causar daños en los riñones, huesos y pulmones debido a su similitud con otros metales como zinc y calcio, pudiendo afectar sus metabolismos (Godt et al., 2006).

Desde hace algunos años existe una gran controversia respecto a la contribución de la cocoa en polvo y otros productos derivados del cacao a la exposición alimentaria al Cd, sobre todo en niños, quienes son los principales consumidores de este tipo de productos. Mientras que en 2013 el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) (World Health Organization y FAO, 2013) concluyó que los productos derivados del cacao no tienen una contribución relevante de Cd a la dieta, otro organismo europeo como la European Food Safety Authority (EFSA) publicó el año anterior un informe donde se afirma que sí lo hacen (European Food Safety Authority, 2012; World Health Organization y FAO, 2013).

Debido a esto, la EFSA estableció una ingesta semanal tolerable de 2,5 $\mu\text{g Cd kg}^{-1}$ de peso corporal. Por otra parte, el JECFA instauró un valor provisional mensual mucho menos severo de 25 $\mu\text{g Cd kg}^{-1}$ de peso corporal (resultando una ingesta semanal tolerable de aproximadamente 6 $\mu\text{g Cd kg}^{-1}$ de peso corporal).

En 2014, la Comisión Reguladora de la Unión Europea estableció niveles máximos (NM) permitidos de Cd en productos derivados del cacao (European Commission, 2014). Estos NM fueron adoptados por el Codex Alimentarius algunos años más tarde (Codex Alimentarius Commission, 2018).

Recientemente, el Codex Alimentarius, mediante el Comité de Contaminantes en Alimentos, disminuyó aún más los NM de Cd en productos derivados del cacao, entre ellos la cocoa en polvo. Se fijó un límite máximo de 2 mg Cd kg^{-1} en cocoa que contenga o declare 100 % del total de sólidos de cacao sobre la base de materia seca (Codex Alimentarius Commission, 2021a). Esta reducción en el NM causó nuevamente controversia debido al aumento en la tasa de rechazo de las exportaciones, y sus consecuencias para el mercado y para los países productores de cacao, principalmente para los exportadores de LAC (Codex Alimentarius Commission, 2021b).

La discusión generada en torno a los nuevos niveles evidenció la falta de datos científicos sobre el contenido de Cd en productos derivados del cacao y su aporte a la ingesta total. La necesidad de contar con estos datos demuestra la relevancia del desarrollo de métodos analíticos confiables para estas determinaciones.

Este trabajo presenta el desarrollo y la validación de un método analítico para la determinación de Cd en cocoa en polvo y una evaluación preliminar de la concentración de Cd en cocoas presentes en el mercado local de la ciudad de Montevideo, Uruguay. Por otra parte, teniendo en cuenta que la cocoa en polvo no es consumida directamente y que su principal forma de consumo es en preparaciones con leche, se realizó la determinación de Cd en una mezcla de cocoa con leche para realizar una estimación primaria de la transferencia de Cd a una preparación de leche chocolatada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Los patrones de calibración se prepararon a partir de una disolución estándar de Cd comercial para absorción atómica de 1000 mg L⁻¹ (Fluka, NY, USA) y utilizando ácido nítrico (HNO₃) 4,5 mol L⁻¹, preparado a partir de HNO₃ 67 % v/v (Merck, Darmstadt, Alemania).

Se utilizó una disolución de Pd(NO₃)₂ 500 mg L⁻¹ como modificador de matriz, preparada a partir de una disolución comercial de Pd(NO₃)₂ 10 g L⁻¹ (Merck, Darmstadt, Alemania).

Se empleó agua ultrapura de resistividad 18,2 MΩcm (ASTM Tipo I), obtenida mediante un purificador Millipore Direct-Q 3 U (Millipore, Bedford, MA, USA).

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica o superior. El material empleado se descontaminó previamente utilizando ácido nítrico 10 % v/v y se enjuagó exhaustivamente con agua ultrapura.

Muestras

Se analizaron 5 muestras de cocoa en polvo que cumplían con la definición de "cocoa en polvo que contiene o declara el 100 % del total de sólidos de cacao sobre la base de materia seca, lista para el consumo", disponibles en el mercado local de la ciudad de Montevideo, Uruguay.

Tratamiento de muestras

Cocoa preparada con leche

La leche chocolatada se preparó siguiendo las indicaciones de preparación sugeridas en los paquetes de las muestras, 3 g de polvo de cocoa se disolvieron en 50 mL de leche entera a 60 °C, se homogeneizó y se dejó llegar a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó la toma en peso correspondiente para la digestión.

Digestión

Se realizó una digestión ácida asistida por microondas utilizando un equipo digestor CEM, Mars 6, provisto con 12 vasos del tipo Easy Prep Plus® (Matthews, NC, USA). Se pesaron 0,5 g de muestra (cocoa en polvo en base tal cual o cocoa preparada como leche chocolatada) en los vasos de reacción del equipo de microondas y se agregaron 10 mL de HNO_3 (4,5 mol L^{-1}). La digestión de muestras complejas utilizando ácido diluido ha sido previamente reportada por nuestro grupo de investigación, como una alternativa al uso de reactivos concentrados, disminuyendo así la cantidad y peligrosidad de los residuos (Machado et al., 2016, Pistón et al., 2019, Iaquinta et al., 2021).

Se utilizó un método de digestión diseñado para alimentos provisto por el equipo. Consiste en una rampa de calentamiento que alcanzó una temperatura de 210 °C y luego se mantuvo a esta temperatura durante 15 min. Después del enfriado se realizó un transvase cuantitativo del producto de la digestión y se llevó a un volumen final de 13,00 mL con agua ultrapura.

Determinación de cadmio

Las determinaciones analíticas se realizaron mediante la técnica de espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS), utilizando un equipo Thermo Scientific iCE 3500 equipado con módulo atomizador de horno de grafito calefaccionado transversalmente (GFS35Z) y un módulo automuestreador (GFS33) (Cambridge, Reino Unido). Se usó 5 μg de paladio como modificador de matriz, la longitud de onda de medida fue de 228,8 nm. En la Figura 1 se presenta el programa de optimización de las temperaturas de pirólisis y atomización obtenidos.

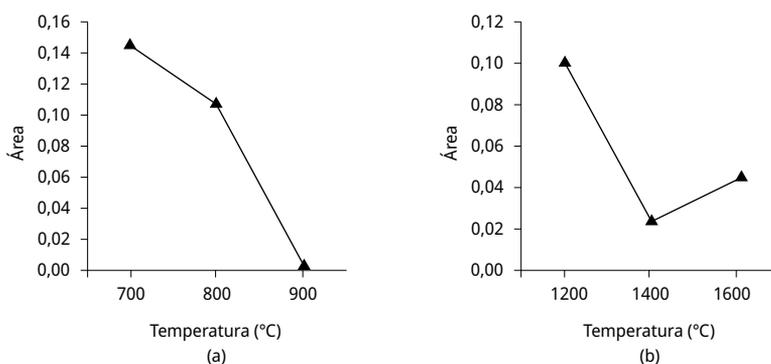


FIGURA 1. Programas de optimización de las temperaturas de pirólisis (a) y atomización (b).

De acuerdo con esta optimización se seleccionan las condiciones experimentales que se presentan en la Tabla 1.

TABLA 1. Programa de temperatura para la determinación de cadmio.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Flujo de gas (L min ⁻¹)
Secado	110 °C	40	0,3
Pirólisis	700 °C	12	0,3
Atomización	1200 °C	3	Apagado
Limpieza	2500 °C	5	0,3

Todas las muestras fueron analizadas por duplicado y se determinaron en simultáneo los blancos de reactivos.

Validación del método analítico

Para la evaluación de la metodología desarrollada se determinaron las principales cifras de mérito recomendadas por la guía europea de validación Eurachem: linealidad, límites de detección y cuantificación, precisión y veracidad (Magnusson y Örnemark, 2014).

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) fueron expresados como el contenido del analito correspondiente a 3 y 10 veces la desviación estándar de la concentración del blanco (criterio 3s y 10s). La linealidad fue evaluada mediante inspección visual de las curvas de calibración, el valor del coeficiente de determinación (R^2) y el estudio de aleatoriedad de los residuales. La precisión fue estudiada como desviación estándar relativa porcentual (RSD %) utilizando réplicas de muestra ($n = 5$). La veracidad fue evaluada como porcentaje de recuperación a partir de material de referencia certificado de leche descremada en polvo para elementos traza (ERM-BD150, valor certificado $0,0114 \pm 0,0029$ mg Cd kg⁻¹) y de harina de arroz (1568a NIST, valor certificado $0,022 \pm 0,002$ mg Cd kg⁻¹) y a partir de fortificaciones sobre muestra ($3 \mu\text{g L}^{-1}$ o $78 \mu\text{g kg}^{-1}$, $n = 4$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Validación del método analítico

Los resultados de la validación se presentan en la Tabla 2.

TABLA 2. Cifras de mérito obtenidas.

Límite de detección (mg kg ⁻¹ en base húmeda / $\mu\text{g L}^{-1}$)	0,003 / 0,103
Límite de cuantificación (mg kg ⁻¹ en base húmeda / $\mu\text{g L}^{-1}$)	0,009 / 0,342
Veracidad (% recuperación) ($n = 4$)*	69 – 106
Precisión (RSD %) ($n = 5$)	2,3 %
Linealidad (0 - $4 \mu\text{g L}^{-1}$)	$R^2 > 0,99$

*Rango obtenido considerando análisis de CRM ERM-BD150, CRM 1568a NIST y fortificaciones sobre muestra a $3 \mu\text{g L}^{-1}$

Si bien las cifras de mérito estarían indicando que el método analítico es adecuado para el fin propuesto, en análisis de alimentos se deben considerar los criterios de calidad fijados por la AOAC. Estos criterios se establecen para métodos de rutina destinados a la vigilancia de metales pesados en alimentos y bebidas, según la monografía AOAC 2012.007 (AOAC International, 2016a).

Respecto a la detectabilidad, la AOAC establece que el límite de detección debe ser menor a $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ expresado en la matriz sólida, criterio que el método propuesto cumple ampliamente. Además, considerando el NM establecido para Cd (2 mg kg^{-1}), es de destacar que los límites de detección y cuantificación del método propuesto son inferiores por varios órdenes, por lo que la detectabilidad resultó adecuada para esta aplicación. Asimismo, son del orden de los obtenidos por reportes anteriores, como el de Lo Dico et al. (2018), para un estudio similar.

Para la evaluación de la precisión, se establece que el RSD % en condiciones de repetibilidad debe ser menor al 15 % para los niveles de concentración considerados, una exigencia mayor a la que surge de la distribución de Horwitz, cercana al 20 % para la concentración de trabajo (Rivera y Rodríguez, 2010). El método propuesto presenta una precisión superior, considerando cualquiera de los criterios. Por último, según la AOAC, la veracidad evaluada como porcentaje de recuperación (ya sea de materiales de referencia o de muestras fortificadas) se debe encontrar entre 60 y 115 %; los valores obtenidos por el método propuesto están dentro de ese rango, por lo que se consideran adecuados para nuestros niveles de trabajo.

Es así que el método desarrollado cuenta con las características de desempeño adecuadas para el objetivo planteado. Además, se utiliza solamente ácido nítrico diluido como reactivo para la digestión, lo que ofrece una ventaja respecto al método de referencia de la AOAC 999.10:2005 (AOAC International, 2016b).

Determinación de Cd en muestras

En esta evaluación se encontró gran variabilidad en las concentraciones de Cd en las distintas muestras, que puede deberse a sus diferencias de origen. Factores como el pH del suelo, la cantidad de materia orgánica, el contenido de iones como zinc y calcio -que dependiendo de sus niveles compiten con la absorción de Cd- también pueden afectar la cantidad y distribución del Cd en la planta. Además, las condiciones de plantación y manejo del cacao, así como el uso de fertilizantes, también generan variabilidad (Gramlich et al., 2017). Solamente dos de las muestras analizadas indicaban su origen, siendo una de ellas de Brasil y la otra de Perú.

Por otra parte, para todas las muestras analizadas el contenido de Cd hallado fue menor al NM establecido por el Codex Alimentarius (2 mg kg^{-1}) (Codex Alimentarius Commission, 2021a). No obstante, todas las muestras contenían Cd en valores cuantificables, lo que justifica ampliamente el monitoreo de este alimento para recopilar datos y realizar estudios sobre cómo afectaría a la salud el consumo habitual del metal durante un largo periodo de tiempo, aunque sea en muy pequeñas cantidades. Resulta muy importante también considerar la forma en que se consume este producto, generalmente en otras preparaciones derivadas, lo que puede disminuir su verdadero acceso a los organismos vivos.

Respecto a la evaluación de la transferencia del Cd desde la cocoa hacia una preparación como una leche chocolatada, se realizó un ensayo simple en el que la transferencia resultó ser menor al 21 %. Si bien es necesario tener en cuenta que pueden existir variaciones en la transferencia debido a otros factores, como el tipo de leche o la cocoa utilizada, esto muestra que el contenido del elemento realmente ingerido es bastante inferior al contenido total. Cabe aclarar que la leche utilizada en la preparación fue analizada en forma independiente para determinar el posible aporte de Cd, y el metal no fue detectado.

Estos estudios de transferencia no suelen ser reportados, pero son una primera aproximación de relevancia ya que estiman de mejor manera la cantidad que efectivamente es ingerida. Es claro que si la materia prima de partida está dentro de los NM admitidos se espera que los derivados sean seguros, pero hay que tener presente también los intereses comerciales de los países productores, quienes se verán muy afectados por las tasas de rechazo de sus productos.

Los resultados obtenidos a partir de las muestras analizadas se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3. Concentración de cadmio en muestras del mercado local.

Muestra	Concentración \pm s (mg kg ⁻¹)
1	0,086 \pm 0,001
2	0,240 \pm 0,006
3	0,052 \pm 0,006
4	0,364 \pm 0,011
5	0,418 \pm 0,016
Cocoa preparada con leche (n = 6)	<0,003

s: desviación estándar de duplicados de muestra.

Concentración: valor promedio de duplicados de muestra.

Aproximación a la contribución a la ingesta semanal tolerable

A modo de ejemplo, solamente para reafirmar la importancia de los monitoreos, los cuales se pueden realizar utilizando el método propuesto, se consideró una situación hipotética: el consumo de cocoa preparada con leche entera siguiendo la preparación sugerida por los fabricantes (2 cucharadas o 12 g de cocoa en polvo por taza de preparación); considerando que el polvo de cocoa tuviese una concentración media de Cd, como la de los resultados obtenidos (0,240 mg kg⁻¹), y suponiendo un consumo semanal de 7 tazas de leche preparada con esta cocoa (1 taza al día). El consumo de Cd en estas condiciones sería de 20 μ g, lo que representaría un 40 % de la ingesta semanal tolerable establecida por la EFSA (2,5 μ g Cd kg⁻¹ de peso corporal) para un niño promedio de 6 años y 20 kg de peso corporal. Esta situación hipotética consideró un 100 % de transferencia del Cd desde la cocoa a la leche chocolatada consumida, lo cual es una situación conservadora.

En el sondeo realizado, la transferencia de Cd desde una de las cochas hacia la preparación resultó ser muy inferior; este hallazgo sugiere una menor contribución a la ingesta semanal tolerable. Sin embargo, no hay estudios que indiquen como afectará este consumo en pequeñas cantidades a lo largo de la vida, ya que el Cd está presente en estos alimentos y seguramente en otros que se consumen en la dieta total.

Cabe destacar que la ingesta semanal tolerable es la máxima cantidad, en este caso de Cd, que puede ingerir una persona semanalmente, durante toda su vida, sin manifestar efectos adversos (European Food Safety Authority, s.d.). Además, para el establecimiento de este valor es necesario realizar estudios que contemplen variables que van desde el contenido total de Cd en los distintos alimentos hasta los hábitos de consumo regionales y por edades, y considerando factores como la transferencia o pérdida de elemento durante la preparación o la absorción del elemento al organismo luego de todos los procesos gastrointestinales. Los factores mencionados ponen de manifiesto que se necesitan más estudios para evaluar la contribución de Cd a través de la dieta en las personas, y sus consecuencias a la salud.

Es claro que estos estudios deben realizarse con mayor número de muestras para confirmar tendencias y obtener conclusiones que aporten en la toma de decisiones.

CONCLUSIONES

Se desarrolló y validó un método analítico para la determinación de Cd en cocoa en polvo y su preparación con leche que cumplió con todas las especificaciones requeridas para ser considerado una alternativa confiable de análisis de estos alimentos. Además, el método desarrollado es más amigable con el ambiente dado que disminuye el consumo de ácido concentrado respecto al método de referencia de la AOAC para análisis de alimentos.

Se realizó una evaluación preliminar del contenido de Cd en cochas en polvo disponibles en el mercado local de Montevideo, constatándose una variación importante en las concentraciones halladas y encontrándose todos los valores muy por debajo del nivel máximo establecido por el Codex Alimentarius (Codex Alimentarius Commission, 2021a). Complementariamente, se discutió sobre el posible aporte de Cd de este alimento a la ingesta semanal tolerable. En este sentido, es importante que se realicen monitoreos de los niveles de este contaminante en productos derivados del cacao, ya que el producto estudiado contiene niveles detectables del metal. Si bien las cantidades halladas son pequeñas, es un producto de consumo a largo plazo. El monitoreo colaboraría a la generación de una base de datos para evaluar el posible efecto de una ingesta prolongada.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Programa de Ciencias Básicas por la financiación recibida.

REFERENCIAS

- Alcívar, L. E. A.; Demera, M. H. D. y Macías, C. J. G., 2022. Cadmio en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) y sus efectos ambientales. En: *La Técnica*, 91.
DOI: https://doi.org/10.33936/la_tecnica.v0i0.4324
- AOAC International, 2016a. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 20a ed. Gaithersburg: AOAC. Official Method 2012.007.
- AOAC International, 2016b. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 20a ed. Gaithersburg: AOAC. Official Method 999.10.
- Chavez, E.; He, Z.; Stoffella, P.; Mylavarapu, R.; Li, Y. y Baligar, V., 2016. Chemical speciation of cadmium: An approach to evaluate plant-available cadmium in Ecuadorian soils under cacao production. En: *Chemosphere*, 150, pp. 57-62.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.013>
- Codex Alimentarius Commission, 2018. *Report of the 12th session of the Codex Committee on Contaminants in Foods*. Roma: FAO.
- Codex Alimentarius Commission, 2021a. *Maximum levels for cadmium in chocolates and cocoa-derived products* [En línea]. Roma: FAO. [Consulta: 14 de mayo de 2023]. Disponible en: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FMeetings%252FCX-735-14%252FWDs-2021%252Fcf14_06e.pdf
- Codex Alimentarius Commission, 2021b. *Informe de la 14ª reunión del comité del Codex sobre contaminantes de los alimentos* [En línea]. Roma: FAO. [Consulta: 14 de marzo de 2023]. Disponible en: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FMeetings%252FCX-735-14%252FREPORT%252FFinalReport%252FREP21_CFs.pdf
- European Commission, 2014. *Commission Regulation (EU) No 488/2014 of 12 May 2014 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of cadmium in foodstuffs* [En línea]. [s.l.]: European Commission. [Consulta: 14 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex:32014R0488>
- European Food Safety Authority, 2012. Cadmium dietary exposure in the European population. En: *EFSA Journal*, 10(1), pp. 2551.
DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2551>
- European Food Safety Authority, s.d. *TWI* [En línea]. [s.l.]: European Food Safety Authority. [Consulta: 14 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://www.efsa.europa.eu/en/glossary/twi>
- Gramlich, A.; Tandy, S.; Andrés, C. R.; Paniagua, J. C.; Armengot, L.; Schneider, M. y Schulin, R., 2017. Cadmium uptake by cocoa trees in agroforestry and monoculture systems under conventional and organic management. En: *Science of The Total Environment*, 580, pp. 677-686. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.014>
- Godt, J.; Scheidig, F.; Grosse-Siestrup, C.; Esche, V.; Brandenburg, P.; Reich, A. y Groneberg, D. A., 2006. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. En: *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 1(1).
DOI: <https://doi.org/10.1186/1745-6673-1-22>
- Hooper, L.; Kay, C. D.; Abdelhamid, A.; Kroon, P. A.; Cohn, J. F.; Rimm, E. B. y Cassidy, A., 2012. Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: a

- systematic review and meta-analysis of randomized trials. En: *The American Journal of Clinical Nutrition*, 95(3), pp. 740-751. DOI: <https://doi.org/10.3945/ajcn.111.023457>
- Iaquinta, F.; Lopes Fialho, L.; Nóbrega, J.A.; Pistón, M. y Machado, I., 2021. Determination of Cd, Pb and Se in beef samples using aerosol dilution by ICP-MS. En: *Food Measurement and Characterization*, 15, pp. 4105-4111. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11694-021-00999-3>
- Lo Dico, G. M. L., Galvano, F., Dugo, G., D'ascenzi, C., Macaluso, A., Vella, A. y Ferrantelli, V., 2018. Toxic metal levels in cocoa powder and chocolate by ICP-MS method after microwave-assisted digestion. En: *Food Chemistry*, 245, pp. 1163-1168. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.052>
- Machado, I.; Dol, I.; Rodríguez-Arce, E.; Cecio, V. y Pistón, M., 2016. Comparison of different sample treatments for the determination of As, Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. subsp. *Cardunculus*). En: *Microchemical Journal*, 128, pp. 128-133. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.04.016>
- Magnusson, B. y Örnemark, U., 2014. *Eurachem guide: the fitness for purpose of analytical methods - a laboratory guide to method validation and related topics*. 2a ed. Torino: Eurachem. ISBN: 978-91-87461-59-0
- Pistón Pedreira, M.M., Silva, J., Suárez, A., Belluzzi, M., Iaquinta, F., Panizzolo, L., Méndez, C. y Cerminara, M., 2019. Estudio del contenido de selenio en carne vacuna luego del proceso de cocción. En: *INNOTEC*, (19), pp.37-51. DOI: <https://doi.org/10.26461/19.05>
- Rivera, C.A. y Rodríguez, M.R., 2010. *Uso de la ecuación de Horwitz en laboratorios de ensayo NMX-EC-17025-IMNC-2006* [En línea]. En: CENAM. *Simposio de metrología 2010*. Santiago de Querétaro, México (27-29 de octubre de 2010). Santiago de Querétaro: CENAM. [Consulta: 6 de setiembre de 2019]. Disponible en: <https://www.cenam.mx/sm2010/info/pviernes/sm2010-vp03c.pdf>
- Sánchez Arizo, V. H.; Zambrano Mendoza, J. L. e Iglesias, C., 2019. *La cadena de valor del cacao en América Latina y el Caribe*. Quito: INIAP, Estación Experimental Santa Catalina. ISBN: 978-9942-36-465-4.
- Vanderschueren, R.; Doevenspeck, J.; Goethals, L.; Andjelkovic, M.; Waegeneers, N. y Smolders, E., 2022. The contribution of cacao consumption to the bioaccessible dietary cadmium exposure in the Belgian population. En: *Food and Chemical Toxicology*, 172, 113599. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.113599>
- World Health Organization y FAO, 2013. *Evaluation of certain food additives and contaminants: 77th report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. Roma: FAO.
- World Health Organization, 2019. *Preventing disease through healthy environments: exposure to cadmium: a major public health concern* [En línea]. Ginebra: WHO. (No. WHO/CED/PHE/EPE/19.4.3). [Consulta: 14 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-CED-PHE-EPE-19-4-3>